

Departamento de Biología

Facultad de Biología



**CONFIRMACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE  
*ADAMTSL3* Y *HMGA2*  
COMO DOS NUEVAS DIANAS DE  
TRANSCRIPCIÓN DE SHOX,  
Y SU IMPLICACIÓN EN LA REGULACIÓN DEL  
CRECIMIENTO ÓSEO.**

Memoria para optar al grado de Doctor de la licenciada:

**Alberta Belinchón Martínez**

Directora de Tesis:

**Dra. Karen Elise Heath**

Diciembre 2013





## **RATIFICACIÓN RAZONADA DE LA AUTORIZACIÓN DE DEFENSA DE LA TESIS DOCTORAL POR LA DIRECTORA DE TESIS**

D<sup>a</sup> Karen E. Heath, Investigadora del Instituto de Genética Médica y Molecular (INGEMM)  
del Hospital Universitario La Paz,

### **CERTIFICA,**

Que Doña Alberta Belinchón Martínez ha realizado bajo mi dirección un trabajo de investigación de tesis doctoral que lleva por título: **“Confirmación y caracterización de *ADAMTSL3* y *HMGA2* como dos nuevas dianas de transcripción de *SHOX*, y su implicación en la regulación del crecimiento óseo”**.

Revisado el presente trabajo, expreso mi conformidad para la presentación del mismo, por considerar que reúne los requisitos necesarios para ser sometida a discusión ante el Tribunal correspondiente, para optar al grado de Doctor por esta Universidad.

En Madrid, a 29 de Noviembre de 2013

Fdo. Dra. Karen E. Heath  
Directora de Tesis  
Instituto de Genética Médica y Molecular (INGEMM)  
Hospital Universitario La Paz





***A mi familia y amigos***



## **AGRADECIMIENTOS**



Es increíble pero todo llega, hace más de un año que abrí una hoja en blanco de Word y escribí "Introducción", y ahora, ocho de la tarde en el mismo laboratorio de hace años, he empezado, por fin, a escribir los deseados y a la vez temidos agradecimientos. Digo, por fin, porque todas me habéis dicho, y teníais razón, que una vez arrancas con esta parte es porque, por fin, estás en la recta final de esta etapa, que da vértigo e ilusión a la vez.

Bueno, al lío, obviamente lo primero de todo gracias a mi laboratorio, al "Comando SHOX".

A **Karen**, por haberme dado la oportunidad de descubrir el mundo de la investigación y porque has sido la culpable de haberme enganchado a ello. A la vez también gracias a **Ángel**, porque siempre se puede recurrir a ti y, claro, por las correcciones. A todos los que habéis estado ahí para lo bueno y para lo malo, mis amigos, y porque siempre siempre he sentido un apoyo en vosotros: **Vero**, por supuesto la primera, mi amiga, gracias porque eres capaz de hacer de un día cualquiera uno que merece la pena, incluso en los momentos bajos es difícil no verte una sonrisa en la cara; **Alfonso**, una amiga más, que en la recta final me has ayudado muchísimo...gracias porque se puede contar contigo para todo y lo demuestras todos los días; **Anito**, qué decir de ti!! Que es como si te conociera de toda la vida, eres energía y buenas vibraciones, y te quiero cerca para siempre, en nuestra cuqui-tienda de comida para llevar o donde sea; **Miri**, ahora tan lejos pero que espero tenerte cerca siempre, dejaría en tus manos mi experimento más importante sin dudarlo, gracias amiga por tu increíble forma de ser y por haber tenido tanta paciencia en enseñarnos a todos!; **Sara**, la persona a la que recurrir siempre que estamos a por uvas en algo, que siempre estás para ayudar y entre todos no paramos de darte la brasa, y que cada año que pasa me siento más cerca y espero que vaya a más; **Olguita**, de las mejores personas con las que he tenido la suerte de cruzarme y con la que espero compartir una amistad para toda la vida; **Eva**, buen rollo con piernas, da gusto estar a tu lado, y ya sabes que me puedes regalar un melli cuando te hartes!; **Silvia y Patri**, que aunque ya no estáis es como si no pasara el tiempo, pero tenemos que reactivar las quedadas de los Jueves!!; **Bea**, otra pringui como yo, **Eva grillo**, **Carol**, gracias por poner las cosas tan fáciles. Constanza, Pedro, Jair, Jesús Molano, Blanca, Paloma, Nacho, Inma y Rocío, Vicky y todos los que formáis parte del INGEMM, gracias.

También quiero agradecer a todas las personas que directamente o de una forma más indirecta me habéis guiado a donde me encuentro en este momento. Remontándome al pasado y en orden cronológico, gracias a la **srta. Rosa**, mi profe de biología, porque fue ella quien me animó a estudiar Química y sobretodo Bioquímica. A **María**, **Martita** y **Lidia**, mis amigas y compañeras de estudios interminables durante la carrera de Bioquímica, y de desahogos durante nuestras tesis. A mi tío **Luis**, **Ramón Cacabelos** y **Lucía Novoa**, que entre todos me descubrieron la

investigación en eBiotec y me dio fuerzas para seguir adelante. A mi "tío" **Félix y Pablo**, porque gracias a ellos estoy donde estoy, en La Paz, haciendo lo que me gusta y disfrutando de ello.

A mis amigas; **Mumu, Blanca, Inma, Vane, Laurita...** porque han sufrido mis altos y bajos desde el principio... y lo que os queda!! También a **Inesita, Carlu, Inés, Kuki y Teresa**, que estais ahí siempre y que le alegráis la vida a cualquiera, y que siempre me preguntáis que para cuando =) !!

Para terminar y por ello lo más importante, a mi familia. **Mamá** que me has apoyado incondicionalmente y siempre me has dado fuerzas, ganas e ilusión. Que cuando ya apuntaba maneras me compraste un libro de frases optimistas!! Jajajja!! Que si la belleza está en el interior, tú eres Miss Universo de todos los universos paralelos que pueda existir. Eres la mejor madre del mundo, no cambiaría nada de ti. **Papá**, que junto con mamá, siempre me has apoyado y a la vez me has dado una opción B, por si acaso... Porque siempre se puede contar contigo para todo, y nunca cambiaría nada de ti, mejor padre del mundo mundial sin duda! **Quchi, Fulgen y Jaime**, increíble que ya esté en este punto, verdad?? Vosotros estáis obligados a llamarme doctora!! Gracias por apoyarme y darme ánimos!! A **Abu** guapo-emprendedor, que eres un ejemplo a seguir, contagias la ilusión y las ganas, y por supuesto también a **Otra mamá**, que juntos no os olvidais nunca de ninguno de nosotros, quiero ser como vosotros!!. También gracias a ti **Abuela**, que sabes que te quiero con locura y se que me apoyarías en cualquier decisión que tomara, y al **Abuelo**, otro ejemplo a seguir en esfuerzo y constancia, pero sobretodo, en como disfrutar de la vida. A **Mariajo y Jose Luis**, que siempre habeis creído en mí, y a mi nueva familia, **Marisi**, mi mejor comercial, a **Javier** (Jefe), y mis cuñados **Javi, Bene, Ito, Marta y Miguel Ángel**, (que ya me ves como premio Nobel, por lo menos!) gracias a todos por confiar en mí.

Y para rematar, y porque los elefantes sólo olvidan por amor, gracias a mi niño, a **Jaime**, porque sin ti no se cuando hubiera terminado, porque cuando no doy el 200% de mí, me pones las pilas y cuando sí lo hago lo valoras, eres una inspiración. Empezamos nueva etapa. Juntos. Que suerte tengo de poder pasar el resto de mi vida a tu lado. TQHLM.

# **RESUMEN**

# **SUMMARY**





## RESUMEN

El gen *SHOX* codifica un factor de transcripción involucrado en el desarrollo esquelético. Se han descrito alteraciones en el gen *SHOX* o sus *enhancers* en pacientes con la displasia esquelética discondrosteosis de Léri-Weill (DLW) y en un pequeño porcentaje de pacientes con talla baja idiopática (TBI). Actualmente, se desconoce el defecto molecular responsable de la DLW en un 30% aproximadamente de los casos. Es por ello, que pensamos que ha de haber otros genes implicados en esta patología, y los genes regulados por *SHOX* podrían ser estos nuevos *loci*. Mediante ensayos de inmunoprecipitación de cromatina y posterior análisis en arrays (ChIP-on-Chip), se identificaron los genes *ADAMTSL3* y *HMGA2* como candidatos a ser dianas de transcripción de *SHOX*. Hemos demostrado, mediante ensayos de inmunohistoquímica, que ambas proteínas colocalizan con *SHOX* en los condrocitos de la placa de crecimiento humana, lo cual es fundamental para poder considerar a estas proteínas dentro de la cascada de señalización de *SHOX*. La confirmación de que *SHOX* regula la expresión de estos genes, se llevó a cabo mediante experimentos de luciferasa y PCR cuantitativa. La búsqueda de mutaciones en estos genes en 116 pacientes con DLW y 175 pacientes con TBI sin defectos en *SHOX* o sus *enhancers*, ha revelado 11 alteraciones en *ADAMTSL3* y una en *HMGA2* que podrían ser patogénicas. Una vez confirmemos la patogenicidad de dichas variantes, se abrirá la posibilidad de diagnosticar y dar consejo genético a pacientes con estas patologías cuya causa molecular subyacente todavía es desconocida. En conclusión, la identificación de *ADAMTSL3* y *HMGA2* como nuevas dianas de transcripción de *SHOX* contribuye a mejorar el conocimiento acerca de la regulación del crecimiento óseo y las rutas de señalización en las que *SHOX* participa.

## SUMMARY

*SHOX* encodes a transcription factor involved in skeletal development. Alterations of *SHOX* and its enhancers have been described in patients with the skeletal dysplasia Léri-Weill dyschondrosteosis (LWD) and in a small percentage of patients with idiopathic short stature (ISS). To date, the molecular defect is unknown in 30% of LWD cases. Therefore, we hypothesized that there must be other genes implicated in this disease, and these new *loci* could be the genes that *SHOX* regulates. Using ChIP-on-Chip, two genes were identified as candidate *SHOX* transcription targets, *ADAMTSL3* and *HMGA2*. Co-expression of *ADAMTSL3* and *HMGA2* with *SHOX* in the chondrocytes of human growth plates has been observed, essential to consider these proteins in *SHOX* signalling pathways. Subsequently, we confirmed that *SHOX* regulates these genes using luciferase reporter assays and quantitative RT-PCR. Mutational screening of *ADAMTSL3* and *HMGA2* in 116 patients with LWD or 175 patients with ISS without a molecular defect in *SHOX* or its enhancers, revealed 11 variants in *ADAMTSL3* and one in *HMGA2*. Pathogenicity of these variants requires confirmation, but if proven, these findings will not only improve genetic diagnosis but all genetic counselling for these patients. In conclusion, the identification of two novel *SHOX* transcription targets, *ADAMTSL3* and *HMGA2*, will help to further understand the regulation of bone development and the signalling pathways where *SHOX* is involved.

## **ABREVIATURAS**



---

ACAN:	Gen codificante de la proteína agrecano
ACG1B:	Acondrogénesis tipo 1B (MIM#600972)
ACH:	Acondroplasia (MIM#100800)
ADAMTS:	Proteína <i>A Desintegrin And Metalloproteinase with Trombospondin motifs</i>
ADAMTSL:	Proteína <i>A Desintegrin And Metalloproteinase with Trombospondin motifs-like</i>
ADN:	Ácido desoxirribonucleico
ADNc:	Ácido Desoxirribonucleico complementario
AMDM:	Displasia Acromesomélica tipo Maroteaux (MIM#602875)
AO2:	Atelosteogénesis tipo 2 (MIM#256050)
ARN:	Ácido ribonucleico
BMPs:	Proteínas Morfogénicas del Hueso (en inglés <i>Bone Morphogenic Proteins</i> )
β-me:	beta-mercaptoetanol
BNP:	Péptido Natriurético Cerebral (en inglés <i>Brain Natriuretic Peptide</i> )
c-myc:	Péptido utilizado como epítipo
C-terminal:	Carboxilo terminal
C3H/10T1/2:	Línea de células mesenquimales de ratón
CENT:	Centrómero
ChIP on Chip:	Ensayo de Inmunoprecipitación de Cromatina y posterior análisis mediante arrays (en inglés <i>Chromatin immunoprecipitation with array technology</i> )
CPMD:	Displasia Campomélica (MIM#114290)
CNE:	Secuencias conservadas no codificantes (en inglés <i>Conserved non-coding elements</i> )
CNP:	Péptido Natriurético de tipo C (en inglés <i>C-type Natriuretic Peptide</i> )
<i>Col10a1</i> :	Gen codificante de la cadena pro-alfa 1 del colágeno tipo X
Col-II:	Colágeno de tipo II
Col-IX:	Colágeno de tipo IX
Col-XI:	Colágeno de tipo XI
DE:	Desviaciones Estándar
dHPLC:	Cromatografía líquida de alta resolución desnaturalizante (en inglés <i>Denaturing High-Performance Liquid Chromatography</i> )
DLW:	Discondrosteosis de Léri-Weill (MIM#127300)
DMEM:	Medio de cultivo de Eagel modificado por Dulbeco (en inglés <i>Dulbeco's Modified Eagles Medium</i> )
DML:	Displasia Mesomélica de Langer (MIM#249700)

DMSO:	Dimetil sulfóxido
dNTPs:	Desoxirribonucleótidos trifosfatos
E. coli:	Células bacterianas, <i>Escherichia Coli</i>
ECR:	Región Evolutivamente Conservada (en inglés <i>Evolutionary Conserved Region</i> )
ECS:	Secuencia Evolutivamente Conservada (en inglés <i>Evolutionary Conserved Sequence</i> )
EMSA:	Ensayo de retardo en la movilidad electroforética (en inglés <i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i> )
ER- $\alpha$ :	Receptor de estrógenos alfa
EVS:	Base de datos <i>Exome Variant Server</i>
EXO-SAP-IT:	Exonucleasa I y Fosfatasa alcalina
FBN1:	Fibrilina-1
FGFs:	Factores de Crecimiento de Fibroblastos (en inglés <i>Fibroblasts Growth Factors</i> )
FGFRs:	Receptores de los factores de Crecimiento de Fibroblastos (en inglés <i>Fibroblasts Growth Factors Receptors</i> )
FLAG:	Péptido utilizado como epítipo
GAPDH:	Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa
GC:	Glucocorticoides
GH:	Hormona de Crecimiento (en inglés <i>Growth Hormone</i> )
GHR:	Receptor de la Hormona de Crecimiento (en inglés <i>Growth Hormone Receptor</i> )
GR:	Receptor de Glucocorticoides
GWAS:	Estudios de Asociación en el Genoma Completo (en inglés <i>Genome Wide Association Studies</i> )
H3ac:	Histona 3 acetilada
H3K4Me3:	Histona 3 trimetilada en la lisina 4
H3K27Me3:	Histona 3 trimetilada en la lisina 27
H3K4Me1:	Histona 3 metilada en la lisina 4
H4ac:	Histona 4 acetilada
HA:	Péptido de la proteína hemaglutinina
HCH:	Hipocondroplasia (MIM#146000)
HD:	Homeodominio
HEK293:	Línea celular de riñón de embrión humano (en inglés <i>Human Embryonic Kidney 293 Cells</i> )
HMG:	Grupo o dominio de alta movilidad (en inglés <i>High Mobility Group</i> )

HMGA2:	Proteína <i>High mobility Group AT-hook 2</i>
HOX:	<i>Homeobox</i>
HOXA9:	Proteína <i>Homeobox A9</i>
HRM:	Análisis de fusión de alta resolución (en inglés <i>High Resolution Melting</i> )
Ig:	Inmunoglobulina
IgG:	Inmunoglobulina G
IGF-I:	Factor de crecimiento tipo insulina I (en inglés <i>Insulin-Like Growth Factor I</i> )
IGF-II:	Factor de crecimiento tipo insulina II (en inglés <i>Insulin-Like Growth Factor II</i> )
IGF1R:	Receptor del factor de crecimiento tipo insulina I (en inglés <i>Insulin like Growth Factor I receptor</i> )
IHH:	Proteína de Indian Hedgehog (en inglés <i>Indian hedgehog</i> )
IP:	Inmunoprecipitación
Kb:	Kilobase
KO:	knock-out
LB:	Medio de crecimiento rico de E.coli (en inglés <i>Lysogeny Broth</i> )
LTBP:	Proteína de unión al factor TGF- $\beta$ latente (en inglés <i>Latent TGF-<math>\beta</math> binding Protein</i> )
MEC:	Matriz Extracelular
MLPA:	Amplificación múltiple de sondas dependientes de ligación (en inglés <i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i> )
mM:	Mili molar
MMPs:	Metaloproteinasas
ng:	Nanogramo
Nkx3.2:	Proteína <i>NK3 homeobox 2</i>
NPPB:	Gen que codifica el Precursor del Péptido Natriurético B (en inglés <i>Natriuretic Peptide Precursor B</i> )
NPRs:	Receptores de los Péptidos Natriuréticos (en inglés <i>Natriuretic peptide Receptors</i> )
OAR:	Dominio <i>Otp, Aristaless, Rax</i>
PAR1:	Región pseudoautosómica 1 (en inglés <i>Pseudoautosomical Region 1</i> )
pb:	Pares de bases
PBS:	Tampón fosfato salino (en inglés <i>Phosphate Buffered Saline</i> )
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa (en inglés <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
PLAC:	Dominio de proteasa y lacunina
Pol2:	Polimerasa 2

PTHrP:	Proteína relacionada con la Hormona Paratiroidea (en inglés <i>Parathyroid Hormone related Protein</i> )
Punctin-2:	Proteína codificada por el gen <i>ADAMTSL3</i> (también <i>ADAMTSL3</i> )
<i>RPSAP52</i> :	Gen que codifica el pseudogen 52 de la proteína ribosómica SA ( <i>Ribosomal protein SA pseudogen 52</i> )
RUNX2:	Factor de transcripción relacionado con Runt2 (en inglés <i>Runt related transcription factor 2</i> )
SADDAN:	Acondrodisplasia severa con retraso en el desarrollo y acantosis nigricans
SDS:	Docedil Sulfato Sódico
SFB:	Suero Fetal Bovino (en inglés <i>Fetal Bovine Serum</i> )
SHOX:	Proteína SHOX (en inglés <i>Short stature homeobox containing protein</i> )
SNP:	Polimorfismo de nucleótido simple (en inglés <i>Single nucleotide polymorphism</i> )
SOX5:	Proteína <i>SRY box5</i>
SOX6:	Proteína <i>SRY box6</i>
SOX9:	Proteína <i>SRY box9</i>
SPR:	Resonancia plasmática superficial (en inglés <i>Surface plasmon resonance</i> )
TBI:	Talla Baja Idiopática (MIM#300582)
TD:	Displasia tanatofórica (MIM#187600)
TEL:	Telómero
TGF-β:	Factor de Crecimiento Transformante β (en inglés <i>Transforming Growth Factor β</i> )
TSR:	Dominio de tipo Trombospondina
U2OS:	Línea celular de osteosarcoma humano
URL:	Unidades relativas de luciferasa
UTR:	Secuencia no traducida (en inglés <i>Untranslated region</i> )
VEGF:	Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (en inglés <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> )
Wnt:	Factor de transcripción, <i>Wingless</i> (en inglés <i>Wingless</i> )
WT:	Silvestre (en inglés <i>wild type</i> )
X-Gal:	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranósido



## ÍNDICE



<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1. Crecimiento y desarrollo humano.....	1
2. Crecimiento óseo .....	1
2.1. El hueso.....	1
2.2. Composición celular del hueso .....	1
2.3. Estructura de los huesos largos.....	2
2.4. Formación de los huesos .....	3
2.4.1. Tipos de osificación.....	3
2.5. Osificación endocondral .....	3
2.6. Estructura de la placa de crecimiento. ....	4
2.7. Regulación de la osificación endocondral.....	6
2.7.1. Regulación hormonal.....	6
2.7.1.1. GH y IGFs .....	6
2.7.1.2. Glucocorticoides .....	7
2.7.1.3. Hormona tiroidea.....	8
2.7.1.4. Estrógenos .....	8
2.7.1.5. Andrógenos.....	8
2.7.2. Regulación a nivel local.....	9
2.7.2.1. FGFs (Factores de Crecimiento Fibroblásticos).....	9
2.7.2.2. BMPs (Proteínas Morfogenéticas del hueso) .....	9
2.7.2.3. Bucle de retroalimentación negativa Ihh-PTHrP.....	10
2.7.2.4. Otros reguladores a nivel local .....	10
2.7.3. Regulación por factores de transcripción .....	11
2.7.3.1. SHOX.....	11
2.7.3.2. Runx2 y Nkx3.2.....	11
2.7.3.3. Trío de Sox .....	12
2.8. La matriz extracelular cartilaginosa.....	13

3. SHOX.....	14
3.1. El gen <i>SHOX</i> .....	14
3.2. La proteína SHOX.....	15
3.3. Regulación de SHOX .....	16
3.4. Expresión de SHOX .....	17
3.5. Función de SHOX en el crecimiento óseo .....	18
3.6. Patologías asociadas al gen SHOX .....	19
3.6.1. La discondrosteosis de Léri-Weill (DLW).....	19
3.6.2. La displasia mesomélica de Langer (DML) .....	21
3.6.3. Talla Baja Idiopática (TBI).....	22
3.7. Búsqueda de nuevos genes regulados por SHOX (Antecedentes) .....	22
<b>HIPÓTESIS .....</b>	<b>25</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>29</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>33</b>
1. Líneas celulares y medios de cultivo .....	35
2. Construcción de los plásmidos.....	35
2.1. pHA- <i>SHOXa</i> .....	35
2.2. pHA- <i>SOX5</i> , pHA- <i>SOX6</i> . y pHA- <i>SOX9</i> .....	35
2.3. pCDNA3.1- <i>ADAMTSL3</i> , - <i>ADAMTS10</i> y fragmentos de <i>ADAMTSL3</i> .....	36
2.4. Clonación del intrón 3 de <i>ADAMTSL3</i> y del intrón 1 de <i>HMGA2</i> .....	36
2.4.1. Subclonación del intrón 3 de <i>ADAMTSL3</i> y del intrón 1 de <i>HMGA2</i> .....	38
2.5. Clonación del intrón 3 de <i>ADAMTSL3</i> y del intrón 1 de <i>HMGA2</i> en la orientación inversa .....	38
2.6. Clonación de los fragmentos del clon inicial del intrón 3 de <i>ADAMTSL3</i> y del intrón 1 de <i>HMGA2</i> .....	39
3. Ensayo de luciferasa .....	39
4. Inmunoprecipitación .....	40

5. PCR cuantitativa .....	40
6. Pacientes y controles.....	41
7. Extracción de ADN.....	42
8. Búsqueda de mutaciones, deleciones y duplicaciones .....	42
8.1. Secuenciación directa .....	42
8.2. HRM.....	42
8.3. Análisis de las variantes identificadas en el gen <i>ADAMTSL3</i> y <i>HMGA2</i> en controles sanos .....	43
8.4. MLPA de diseño propio.....	43
8.5. Análisis del grado de patogenicidad de las variantes identificadas en <i>ADAMTSL3</i> y <i>HMGA2</i> .....	44
8.6. Análisis del efecto de las variantes sobre el mecanismo de <i>splicing</i> .....	45
9. Inmunohistoquímica .....	45
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>47</b>
1. <i>ADAMTSL3</i> .....	49
1.1. Confirmación de <i>ADAMTSL3</i> como diana de transcripción de SHOX .....	49
1.1.1. Comparación de la actividad represora de SHOX sobre <i>ADAMTSL3</i> en otros tipos celulares.....	50
1.1.2. Efecto del trío de SOX en la regulación de SHOX sobre <i>ADAMTSL3</i> .....	52
1.1.3. Delimitación del elemento regulador presente en el intrón 3 de <i>ADAMTSL3</i> .....	53
1.2. Efecto de SHOX sobre la expresión endógena de <i>ADAMTSL3</i> .....	54
1.3. Análisis del efecto de las mutaciones de SHOX sobre la regulación de <i>ADAMTSL3</i> .....	55
1.4. Ensayos funcionales con <i>ADAMTSL3</i> .....	56
1.4.1. Confirmación de la interacción entre <i>ADAMTSL3</i> y <i>ADAMTS10</i> .....	56
1.4.2. Identificación del dominio de <i>ADAMTSL3</i> responsable de la unión a <i>ADAMTS10</i> .....	57
1.5. Coexpresión de <i>ADAMTSL3</i> y SHOX en la placa de crecimiento humana .....	57
1.6. Rastreo de mutaciones en <i>ADAMTSL3</i> .....	61
1.6.1. Rastreo de mutaciones puntuales y pequeñas deleciones/inserciones .....	61

1.6.1.1. Análisis de nuevas variantes en <i>ADAMTSL3</i> .....	63
1.6.1.1.1. Familia 1: variante c.724A>G; p.K242E .....	63
1.6.1.1.2. Familia 2: variante c.2441G>A; p.C814Y .....	64
1.6.1.1.3. Familia 3: variante c.2941C>T; p.R981W .....	65
1.6.1.1.4. Familia 4: variante c.3406A>G; p.M1136V .....	67
1.6.1.1.5. Familia 5: variante c.4517G>A; p.R1506Q .....	68
1.6.1.1.6. Familia 6: variante c.1295T>C; p.V432A .....	69
1.6.1.1.7. Familia 7: variante c.2015T>C; p.L672S .....	70
1.6.1.1.8. Familia 8: variante c.2459C>T; p.P820L .....	72
1.6.1.1.9. Familia 9: variante c.3025A>T; p.R1009W .....	73
1.6.1.1.10. Familia 10: variante c.4526C>T; p.T1509M .....	74
1.6.1.1.11. Familia 11: variante c.1701G>A; p.T567T .....	75
1.6.2. Análisis de deleciones y duplicaciones en el gen <i>ADAMTSL3</i> .....	77
2. <i>HMGA2</i> .....	79
2.1. Caracterización de <i>HMGA2</i> como diana de transcripción de SHOX .....	79
2.1.1. Comparación de la actividad represora de SHOX sobre <i>HMGA2</i> en otros tipos celulares .....	80
2.1.2. Delimitación del elemento regulador en <i>HMGA2</i> .....	81
2.2. Efecto de SHOX sobre la expresión endógena de <i>HMGA2</i> .....	83
2.3. Efecto de SHOX sobre la expresión endógena de <i>RPSAP52</i> .....	84
2.4. Análisis del efecto de las mutaciones de SHOX sobre la regulación de <i>HMGA2</i> .....	85
2.5. Coexpresión de SHOX y <i>HMGA2</i> en la placa de crecimiento humana .....	86
2.6. Rastreo de mutaciones en <i>HMGA2</i> .....	88
2.6.1. Rastreo de mutaciones puntuales y pequeñas deleciones/inserciones en <i>HMGA2</i> ..	88
2.6.2. Análisis de deleciones y duplicaciones en el gen <i>HMGA2</i> .....	89
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>91</b>
1. <i>ADAMTSL3</i> .....	93
1.1. Confirmación y caracterización de <i>ADAMTSL3</i> como diana de transcripción de SHOX ....	93
1.2. Implicación e importancia de la familia de proteínas ADAMTS(L) en el crecimiento óseo .....	95

1.3. Rastreo de mutaciones y deleciones/duplicaciones en <i>ADAMTSL3</i> .....	98
1.4. Teorías sobre la función fisiológica de SHOX y <i>ADAMTSL3</i> en el crecimiento óseo .....	100
2.HMGA2 .....	103
2.1. Confirmación y caracterización de <i>HMGA2</i> como diana de transcripción de SHOX .....	103
2.2. Teorías sobre la función fisiológica de SHOX y <i>HMGA2</i> .....	105
2.3. Búsqueda de mutaciones y deleciones/duplicaciones en <i>HMGA2</i> .....	107
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>109</b>
CONCLUSIONES <i>ADAMTSL3</i> .....	111
CONCLUSIONES <i>HMGA2</i> .....	112
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>113</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>131</b>





# INTRODUCCIÓN



## 1. CRECIMIENTO Y DESARROLLO HUMANO

El crecimiento y desarrollo de un individuo es un fenómeno continuo pero no uniforme que se inicia en el momento de la concepción y culmina al final de la pubertad, período durante el cual se alcanza la madurez en sus aspectos físico, psicosocial y reproductivo. Esta transformación involucra cambios en el tamaño, organización espacial y diferenciación funcional de tejidos y órganos. El aumento en el tamaño y masa corporal es el resultado de la multiplicación e hiperplasia celular, proceso conocido como **crecimiento**. Los cambios en la organización y diferenciación funcional de tejidos, órganos y sistemas son el resultado del proceso de **desarrollo**.

Estos procesos están altamente regulados por diversos factores, tanto endógenos (factores genéticos, metabólicos y hormonales) como exógenos (alimentación y factores ambientales).

## 2. CRECIMIENTO ÓSEO

### 2.1. El hueso

El conjunto formado por los huesos, músculos y articulaciones (unidos con los tendones, ligamentos y cartílagos) conforman el sistema osteomuscular. Los huesos del esqueleto humano que forman parte de este sistema tienen diversas funciones, como ser el sostén de nuestro cuerpo, ayudar a darle forma y, además, proteger sus órganos, permitir el movimiento y contribuir a la formación de células sanguíneas.

El hueso está compuesto por múltiples tipos de tejidos y estructuras. El componente principal es el tejido óseo, luego encontramos el tejido conectivo y adiposo en la cavidad medular (espacio que contiene médula ósea) y tejido cartilaginoso en los extremos articulares. En las zonas de crecimiento se encuentra el periostio (membrana delgada que envuelve al hueso), los vasos sanguíneos y los nervios.

### 2.2. Composición celular del hueso

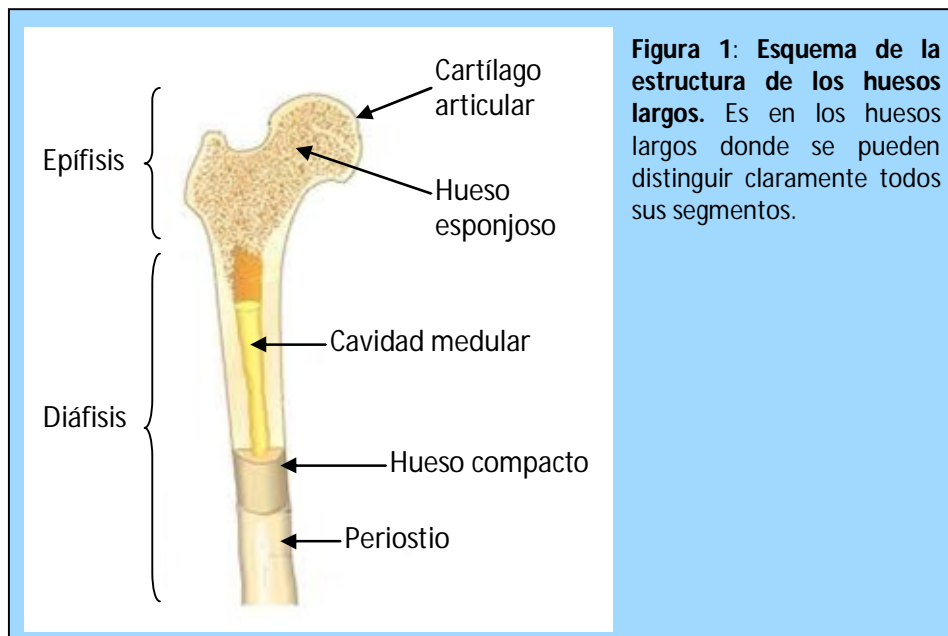
En el hueso maduro podemos encontrar tres tipos de células vivas que son responsables del remodelado óseo y que se encuentran rodeadas por una sustancia inerte y dura. Los **osteoblastos** son los encargados de producir la matriz ósea, depositando hueso nuevo durante la osificación o rellenando los túneles que generan los osteoclastos. Los osteoblastos acaban rodeados por gran cantidad de matriz, quedando aislados y en un estado latente, en este momento pasan a ser **osteocitos**. A pesar de la gran cantidad de matriz que rodea a los osteocitos, éstos permanecen en contacto a través de largas prolongaciones celulares que recorren los pequeños canales óseos, lo

que es importante para controlar la actividad celular en el interior del hueso. Las células que reabsorben el hueso formando túneles y cavidades son los **osteoclastos**. El equilibrio entre las actividades de los osteoblastos y osteoclastos hace que el hueso se esté remodelando permanentemente.

### 2.3. Estructura de los huesos largos

Para describir la estructura del hueso se utiliza como ejemplo el hueso largo, ya que en ellos se aprecian claramente todos los segmentos óseos (Figura 1).

En ambos extremos del hueso se localiza la **epífisis**, que forma una articulación con el hueso contiguo. Este segmento está recubierto por una capa de cartílago en su superficie externa, llamado **cartílago articular**. Esta capa es resistente al desgaste y produce un mínimo de fricción al comprimirse cuando la articulación se mueve. La epífisis se compone en gran parte de **hueso esponjoso** con delgadas capas de hueso compacto en su superficie. El eje del hueso, que se encuentra entre las dos epífisis, se llama **diáfisis**. Excepto por el cartílago articular presente en los extremos, el hueso está totalmente cubierto por un tejido fibroso, duro y vascular llamado **periostio**. La pared de la diáfisis está compuesta por **hueso compacto**, que es muy sólido, fuerte y resistente, y que en los huesos largos forma un tubo rígido con una cámara hueca llamada **cavidad medular**, donde se encuentra la médula ósea.



**Figura 1: Esquema de la estructura de los huesos largos.** Es en los huesos largos donde se pueden distinguir claramente todos sus segmentos.

## 2.4. Formación de los huesos

### 2.4.1. Tipos de osificación

El esqueleto se forma a partir de la condensación de células mesenquimales, que hacen de molde para los futuros huesos. Posteriormente tiene lugar el proceso de osificación u osteogénesis, que comienza en la octava semana del desarrollo del embrión. Hay dos tipos de osificación:

1. Osificación intramembranosa: En ella las células mesenquimales dan lugar directamente a osteoblastos, que comienzan a depositar matriz ósea. Mediante este mecanismo se forman los huesos planos del esqueleto, como los huesos del cráneo, mandíbula y clavículas.
2. Osificación endocondral: En este proceso primero se forma un molde de cartilago a partir de las células mesenquimales y posteriormente el cartílago es reemplazado por hueso. Así se forman la mayor parte de los huesos del cuerpo.

A continuación se describe con más detalle el proceso de osificación endocondral, ya que es fundamental en la presente Tesis Doctoral.

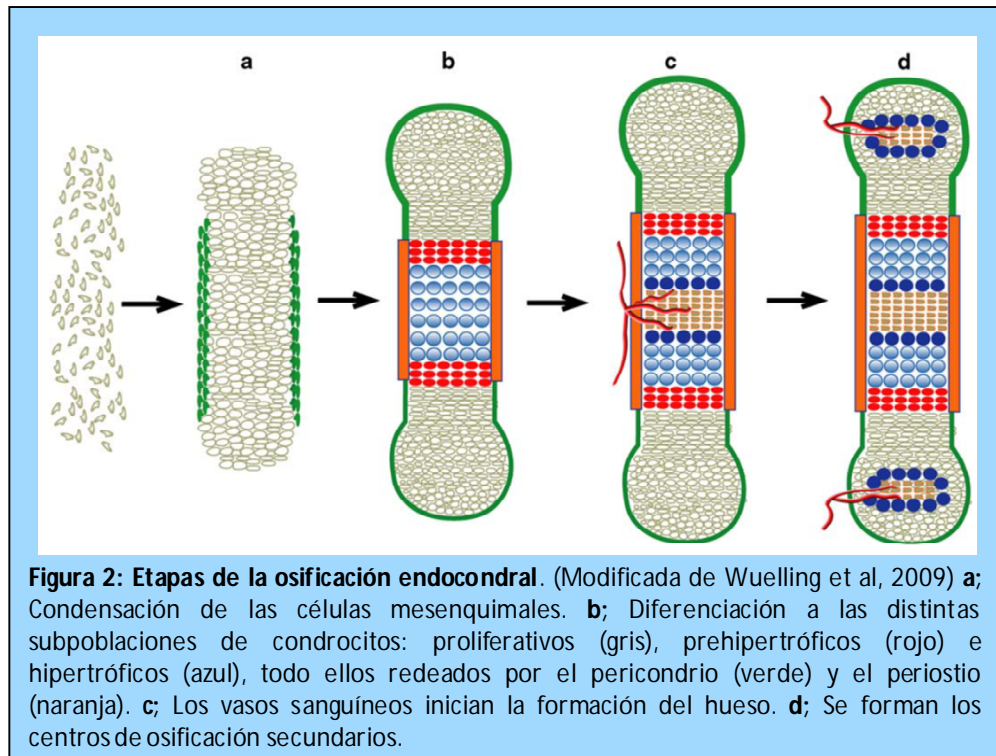
## 2.5. Osificación endocondral

Es la fase más temprana del desarrollo esquelético. Este proceso, se inicia con la formación del cartílago a partir de la condensación de células mesenquimales, así como con la formación del pericondrio, una membrana que rodea el molde cartilaginoso (Figura 2-a). Posteriormente las células mesenquimales se diferencian a condrocitos y comienzan a producir matriz cartilaginosa. Durante la elongación del hueso se pueden diferenciar dos subpoblaciones de condrocitos: los condrocitos con bajo nivel de proliferación y los de alto nivel de proliferación, que se encuentran en el centro de la diáfisis y se organizan en forma de columnas (Figura 2-b).

El siguiente paso es la formación del **centro de osificación primario**. Una arteria penetra en el pericondrio y en el cartílago en calcificación, lo que estimula a las células del pericondrio a diferenciarse a osteoblastos para que formen el periostio. Los capilares que se generan en esta región inducen el crecimiento del centro de osificación primario, donde el tejido cartilaginoso es sustituido por tejido óseo (Figura 2-c). La osificación endocondral avanza desde la diáfisis hacia las epífisis de manera que el hueso va creciendo en longitud. Posteriormente, los osteoblastos comienzan a depositar matriz ósea sobre los residuos del cartílago calcificado formando las trabéculas del hueso esponjoso. Después los osteoclastos destruyen estas trabéculas recién

formadas, dando lugar a la cavidad medular que más tarde se llenará con médula ósea roja, donde tendrá lugar la hematopoyesis.

Cuando los vasos sanguíneos penetran la epífisis se forman los **centros de osificación secundarios**, aproximadamente en el momento del nacimiento (Figura 2-d). El proceso que tiene lugar es el mismo que en los centros de osificación primarios, a excepción de que no se destruyen las trabéculas, sino que el hueso esponjoso permanece en el interior de la diáfisis.



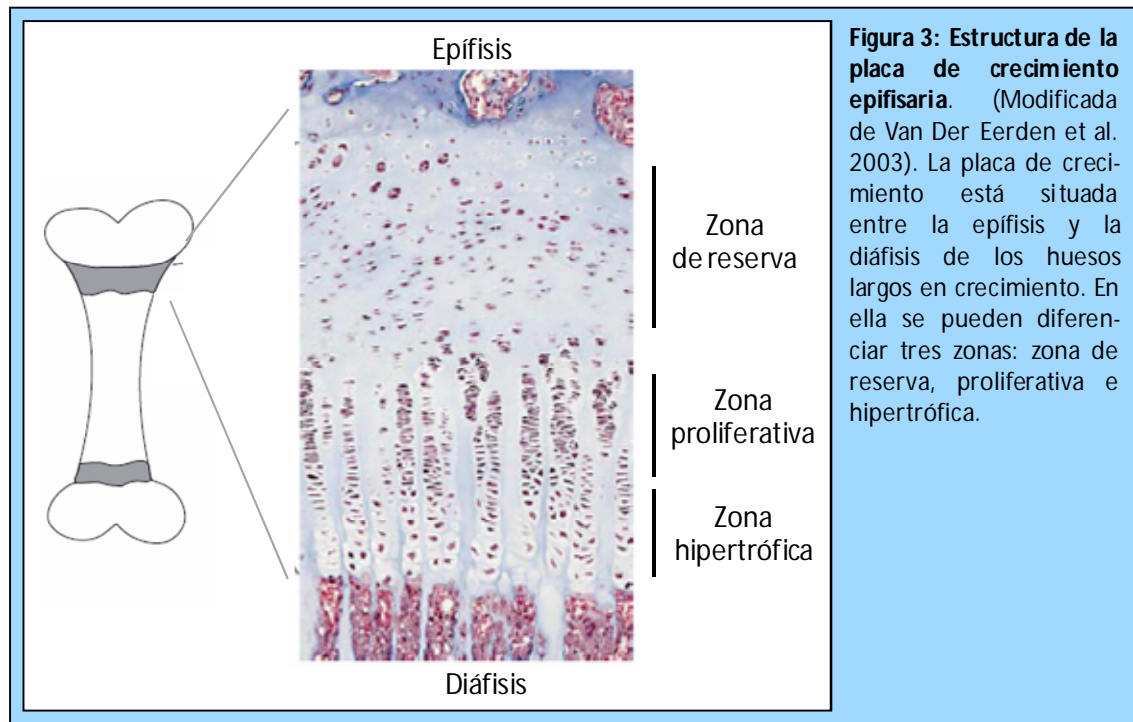
Durante la osificación secundaria se conserva, entre la diáfisis y la epífisis, el cartílago que hizo de molde para la formación del hueso, ahí los condrocitos forman la llamada **placa de crecimiento epifisaria**, que crece hacia la parte externa del hueso y es la que permite el crecimiento longitudinal hasta el final del desarrollo.

## 2.6. Estructura de la placa de crecimiento.

Durante el crecimiento óseo, los condrocitos de la placa de crecimiento epifisaria llevan a cabo una serie de etapas de diferenciación programadas y ordenadas. Estos estadios de diferenciación permiten distinguir tres zonas en la placa (Figura 3):

- **Zona de reserva:** Es la zona más cercana a la epífisis. En ella los condrocitos presentan una forma redondeada y se encuentran en un estado casi quiescente. Parece que estos condrocitos son claves para la orientación unidireccional del crecimiento del hueso (Abad et al, 2002).

- **Zona proliferativa:** Los condrocitos que entran en la zona proliferativa, adoptan una forma más plana y comienzan a dividirse activamente, colocándose en *clusters* multicelulares en forma de columnas paralelas al eje longitudinal del hueso. Esta es la zona responsable del crecimiento longitudinal del hueso, tanto por la división de los condrocitos, como por la secreción continua de componentes a la matriz extracelular por parte de los propios condrocitos.
- **Zona hipertrófica:** En un momento determinado los condrocitos proliferativos pierden su capacidad de división y comienzan a diferenciarse hacia condrocitos hipertróficos. En este punto, aumentan drásticamente su volumen celular (lo que también contribuye a la elongación final del hueso), calcifican la matriz extracelular, secretan factores que atraen a los vasos sanguíneos y finalmente mueren por apoptosis.



**Figura 3: Estructura de la placa de crecimiento epifisaria.** (Modificada de Van Der Eerden et al. 2003). La placa de crecimiento está situada entre la epífisis y la diáfisis de los huesos largos en crecimiento. En ella se pueden diferenciar tres zonas: zona de reserva, proliferativa e hipertrófica.

La región entre la diáfisis y las epífisis en la que la matriz calcificada es sustituida por hueso, se denomina **metáfisis**. Durante el crecimiento, el proceso de calcificación y sustitución por hueso hace que la diáfisis sea cada vez más larga, pero el tamaño de la placa epifisaria permanece constante. Al final del desarrollo, el hueso formado en el centro de osificación primario se fusiona con el de los centros de osificación secundarios, de manera que la placa de crecimiento epifisaria desaparece. Este proceso se denomina **fusión epifisaria** y es consecuencia de que los condrocitos tienen una capacidad finita de proliferación (Gafni et al, 2001; Weise et al, 2001).

El equilibrio entre el nivel de proliferación e hipertrofia de los condrocitos es fundamental para el desarrollo normal de los huesos. Por ello, es un proceso altamente regulado por factores

de transcripción, hormonas y factores de crecimiento. La normalidad de este proceso requiere la expresión normal, organizada y secuencial de todos los factores que lo controlan. Errores en este proceso de osificación endocondral pueden dar lugar a alteraciones en el crecimiento y deformidades esqueléticas.

## **2.7. Regulación de la osificación endocondral**

La regulación de la osificación endocondral tiene como fin que la longitud final del hueso sea la correcta. Este sistema se basa fundamentalmente en mantener el ratio entre el número de condrocitos proliferativos con respecto al de condrocitos que se diferencian hacia hipertróficos. Este proceso de regulación tiene lugar en la placa de crecimiento. Es muy complejo e incluye tanto el control por regulación hormonal (sistémica y local) como el control por factores de transcripción.

### **2.7.1. Regulación hormonal**

El proceso de crecimiento longitudinal del hueso está controlado por una complicada red de señales endocrinas. Muchas de estas señales actúan en la placa de crecimiento, tanto de forma local sobre los condrocitos, como de forma indirecta modulando otras señales endocrinas de esta red.

La capacidad de los huesos para crecer depende de la edad y el estado de desarrollo del individuo. Se ha visto que en trasplantes de placa de crecimiento, la capacidad del hueso para elongarse depende de la edad del animal donante y no de la edad del receptor (Stevens et al, 1999). Por otro lado, el crecimiento óptimo requiere un estado de salud y nutrición correctos, si esto no ocurre los niveles hormonales varían y el crecimiento se detiene de manera irreversible.

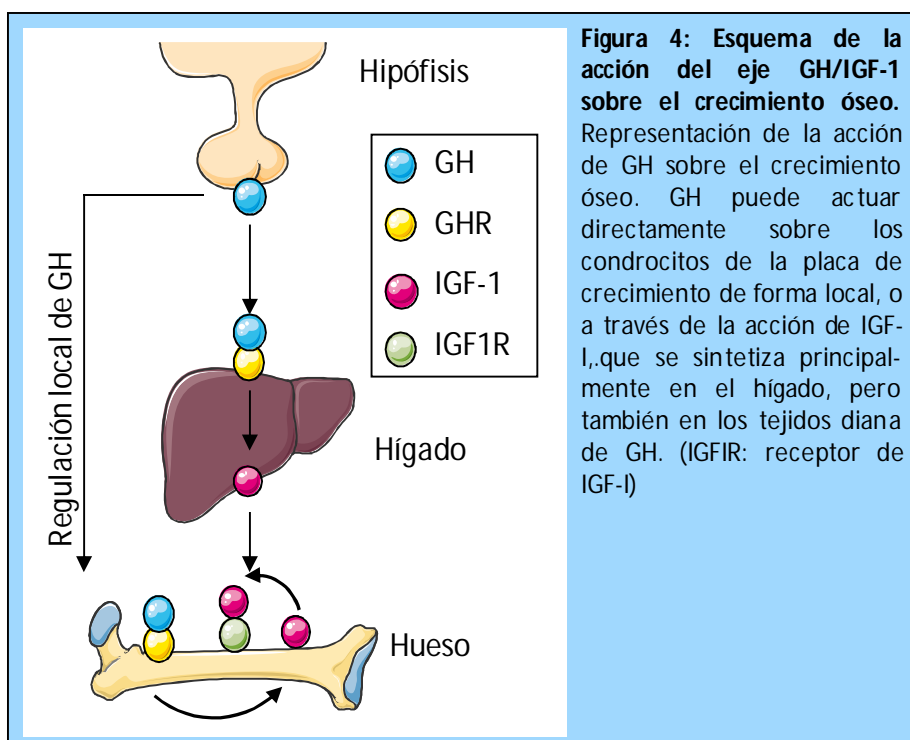
Dado que son varias las hormonas que están implicadas, se describirán las que se han considerado más importantes por separado.

#### **2.7.1.1. GH y IGFs**

La Hormona de Crecimiento (*Growth Hormone* o GH) y los factores de crecimiento similares a insulina I y II (*Insulin-Like Growth Factors* o IGF-I, IGF-II) son estimuladores muy potentes del crecimiento óseo longitudinal. El exceso de GH, debido a adenomas pituitarios en la infancia, da lugar a gigantismo (Glasker et al, 2011). Mientras que la deficiencia o insensibilidad a GH, debido a defectos en la vía de GH o a mutaciones en su receptor *GHR*, producen hipocrecimiento armónico postnatal (Rosenfeld et al, 1994; Wit et al, 1996; Kofoed et al, 2003).



El papel de la GH es promover el crecimiento postnatal de los órganos y tejidos, para lo que necesita la acción conjunta de IGF-I. La GH se sintetiza en las células somatotrópicas de la hipófisis, y durante la fase de crecimiento postnatal promueve la síntesis de IGF-I principalmente en el hígado, pero también en otros tejidos diana. La acción estimuladora del eje GH/IGF-I sobre el crecimiento óseo se consigue mediante dos vías: en la primera GH actúa de manera directa sobre la placa de crecimiento reclutando condrocitos de reserva para que comiencen a proliferar (Ohlsson et al, 1992); en la segunda GH actúa a través de la estimulación de la síntesis de IGF-I y de sus proteínas transportadoras, IGFBP3 y ALS principalmente, tanto en el hígado como en la propia placa de crecimiento, de manera que puede actuar paracrina y autocrinamente para estimular la proliferación de los condrocitos (Schlechter et al, 1986; Isaksson et al, 1987; Isgaard et al, 1988) (Figura 4).



#### 2.7.1.2. Glucocorticoides

Los glucocorticoides (GC) se utilizan frecuentemente como antiinflamatorios e inmunosupresores en niños. Su uso a largo plazo da lugar a retraso en el crecimiento debido a la inhibición de la proliferación de los condrocitos (Gafni et al, 2001; Silvestrini et al, 2000; Crisis et al, 2003). El receptor de glucocorticoides (GR) se expresa en la placa de crecimiento, especialmente en condrocitos hipertróficos (Abu et al, 2000). Los GC inhiben el crecimiento mediante un efecto local, en el que modifican el eje GH/IGF-I en la placa de crecimiento epifisaria.

#### **2.7.1.3. Hormona tiroidea**

La hormona tiroidea es necesaria para que el crecimiento y la maduración esquelética sean normales. El hipotiroidismo ralentiza el crecimiento longitudinal del hueso, mientras que el hipertiroidismo lo acelera (Bassett et al, 2003). La hormona tiroidea regula la transición de condrocitos proliferativos hacia hipertróficos en la placa de crecimiento (Shao et al, 2006).

Los efectos de la hormona tiroidea se dan tanto de forma directa sobre la placa de crecimiento (Miura et al, 2002; Robson et al, 2000), como de forma indirecta actuando sobre GH, IGF-I y el bucle *Ihh-PTHrP* (*Indian hedgehog*-Proteína relacionada con la Hormona Paratiroidea) (Bassett et al, 2009).

#### **2.7.1.4. Estrógenos**

Durante la pubertad, el frente de osificación alcanza a la placa de crecimiento y se da la fusión epifisaria entre el hueso formado en el centro de osificación primario y el formado en los centros de osificación secundarios. Este proceso ocurre bajo el control de los estrógenos, que son las hormonas responsables del estirón puberal.

La exposición prematura a estrógenos acelera la fusión epifisaria y resulta en una disminución de la talla final, mientras que la falta de estrógenos retrasa la fusión y da lugar a una talla más alta. Como se ha mencionado en el apartado 2.6, la fusión epifisaria se da cuando los condrocitos agotan su capacidad proliferativa, el papel de los estrógenos sería el de acelerar el proceso de senescencia causando una fusión prematura (Weise et al, 2001). Los efectos de los estrógenos se producen de forma directa a través de su receptor (ER- $\alpha$ ), que se expresa en los condrocitos de la placa de crecimiento (Nilsson et al, 2005), y de forma indirecta, mediante la estimulación del eje GH/IGF-I (Grumbach et al, 2000).

#### **2.7.1.5. Andrógenos**

Los andrógenos dan lugar a los estrógenos mediante una reacción de aromatización catalizada por una aromatasa que se expresa en el cartílago de la placa de crecimiento (Oz et al, 2001). Los andrógenos, junto con los estrógenos, son responsables del estirón puberal, en parte por su conversión local a estrógenos en la propia placa de crecimiento, pero también por un efecto en sí mismos, ya que su receptor se expresa en el cartílago de la placa de crecimiento. Este efecto es independiente de GH o IGF-I (Oz et al, 2001).

## **2.7.2. Regulación a nivel local**

### **2.7.2.1. FGFs (Factores de Crecimiento Fibroblásticos)**

La familia de los FGFs (*Fibroblasts Growth Factors* o Factores de Crecimiento de Fibroblastos) está compuesta por 22 factores que interaccionan con cuatro receptores (FGFRs). Tanto FGF-1 y -2, como los receptores FGFR-1, -2 y -3, se expresan en condrocitos (Ornitz et al, 2002).

La importancia de la vía de señalización de los FGFs en el desarrollo esquelético se conoció con el descubrimiento de una mutación puntual, p.G380R, en el gen *FGFR3* como causante de la acondroplasia (ACH, MIM#100800). A partir de ahí, se han asociado otras displasias esqueléticas a este gen, como la hipocondroplasia (HCH, MIM#146000), displasia tanatofórica (TD, MIM#187600) y la acondrodisplasia severa con retraso en el desarrollo y acantosis nigricans. Todas estas displasias cursan con algún tipo de enanismo y están causadas por mutaciones de ganancia de función en *FGFR3*. Por otro lado, se ha visto en ratones que mutaciones de pérdida de función de *FGFR3* dan lugar a un incremento en su longitud ósea (Deng et al, 1996; Colvin et al, 1996). El conjunto de estos datos sugiere que la vía de señalización de FGFR3 regulada negativamente la condrogénesis, ya que inhibe la proliferación e induce la hipertrofia de los condrocitos (Ornitz et al, 2005).

### **2.7.2.2. BMPs (Proteínas Morfogenéticas del hueso)**

Las proteínas BMPs (*Bone Morphogenic Proteins* o Proteínas Morfogénicas del Hueso) son unas citoquinas que forman una subfamilia de unos 15 miembros, que pertenece a la superfamilia de moléculas de señalización de TGF- $\beta$ . La importancia de estas citoquinas se descubrió cuando se puso en evidencia su capacidad para inducir la formación de cartílago y hueso fuera de su lugar habitual. Ahora se sabe que, además de ser estimuladoras de la formación de hueso, son importantes reguladoras del crecimiento, diferenciación y morfogénesis durante la etapa embrionaria (Redi et al, 2001).

La mayoría de estas proteínas se expresan en el pericondrio de los huesos largos en crecimiento, y algunas de ellas en condrocitos (Ramel et al, 2012). La señal mediada por las BMPs es fundamental para la condensación de células mesenquimales y para la formación de las articulaciones (Pizette et al, 2000; Brunet et al, 1998). Se ha visto que defectos en ciertas BMPs, sus receptores o los factores que median en sus cascadas de señalización, dan lugar a defectos óseos en ratones, como por ejemplo, crecimiento y mineralización reducidos (Geiser et al, 2005) o ausencia de la parte distal de las vértebras (Dunker et al, 2002).

Éstos datos indican que las proteínas BMPs regulan positivamente la proliferación de los condrocitos y negativamente su diferenciación (Minina et al, 2001).

### **2.7.2.3. Bucle de retroalimentación negativa Ihh-PTHrP**

La proteína IHH (Indian hedgehog), la proteína relacionada con la hormona paratiroidea (PTHrP) y su receptor (receptor PTH/PTHrP), forman un bucle de retroalimentación negativo que controla el ratio de células proliferativas con respecto a las que pasan a diferenciarse a condrocitos hipertróficos (Kronenberg et al, 2006).

Ihh pertenece a la familia de proteínas hedgehog, que juegan un papel importante en el desarrollo embrionario. Se expresa en condrocitos hipertróficos (Kronenberg et al, 2003) y su función es regular positivamente el paso de condrocitos proliferativos a hipertróficos (Vortkamp et al, 1996; St Jacques et al, 1999). Por otro lado, PTHrP se expresa en el pericondrio (Kronenberg et al, 2006), mientras que su receptor, PTH/PTHrP de tipo I, se encuentra en condrocitos proliferativos tardíos e hipertróficos tempranos (Vortkamp et al, 1996; Karperien et al, 1994). IHH es necesaria para que PTHrP se exprese (Karp et al, 2000; St Jacques et al, 1999). El papel de PTHrP es mantener los condrocitos en estado proliferativo y bloquear el paso a la hipertrofia (Karaplis et al, 1994; Lanske et al, 1996; Weir et al, 1996).

El bucle de retroalimentación modula los niveles de PTHrP e IHH para controlar el ratio de condrocitos proliferativos que se diferencian a hipertróficos, de manera que la expresión de IHH induce a los condrocitos a pasar de un estado proliferativo a uno hipertrófico. A la vez, IHH difunde hacia el pericondrio donde estimula la expresión de PTHrP que a su vez difunde hacia los condrocitos hipertróficos tempranos de la placa de crecimiento, donde se expresa su receptor. Ahí inhibe la diferenciación de los condrocitos proliferativos a hipertróficos, controlando así la expresión de Ihh y en consecuencia la de PTHrP (Vortkamp et al, 1996; Lanske et al, 1996).

En los últimos años, diferentes estudios han demostrado que la vía de señalización de FGF y de las BMPs, interaccionan con la vía IHH/PTHrP. Parece que la vía FGF inhibe la actividad de IHH (Minina et al, 2002), mientras que las BMPs son un regulador positivo de IHH (Minina et al, 2001).

### **2.7.2.4. Otros reguladores a nivel local**

En esta sección se han descrito los factores que se han considerado más relevantes para la presente Tesis Doctoral, pero además de estos, existen otros muchos que también son fundamentales en la regulación de la placa de crecimiento. Algunos de ellos son el Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF o *Vascular Endothelial Growth Factor*), que está implicado en la angiogénesis de la placa de crecimiento, o la familia de proteínas Wnt (*Wingless*), que es capaz de controlar la diferenciación de los condrocitos.

### 2.7.3. Regulación por factores de transcripción

Existen numerosos factores de transcripción implicados en el control del crecimiento óseo. A continuación se presentan los que se han considerado más importantes en el contexto de la presente Tesis Doctoral.

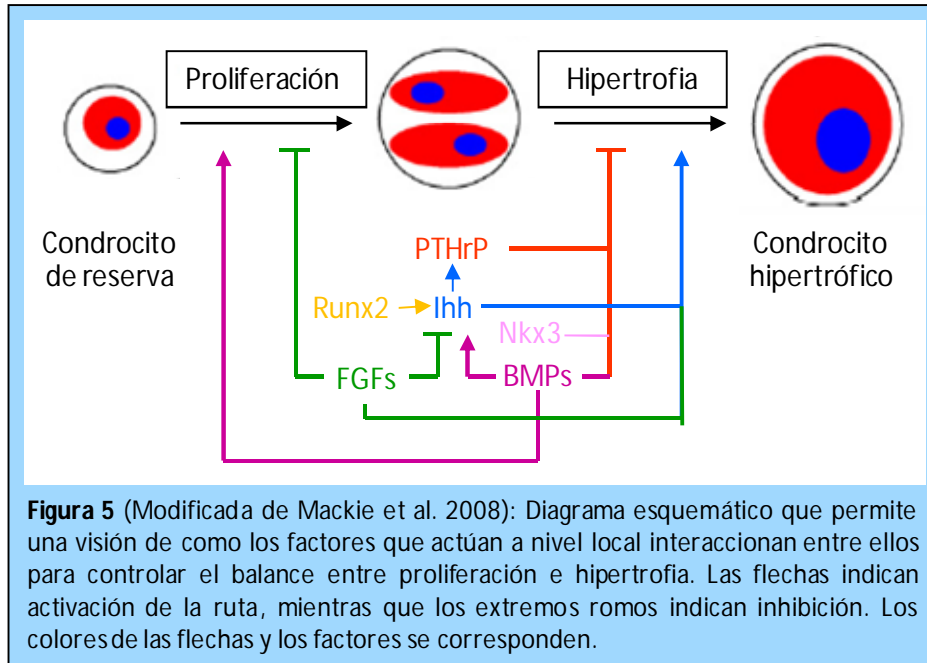
#### 2.7.3.1. SHOX

SHOX (Short stature homeobox containing protein) es un factor de transcripción implicado en la osificación endocondral, ya que defectos en este gen se asocian con displasias esqueléticas que cursan con talla baja. Dado que SHOX es el eje central de esta Tesis Doctoral, me centraré en este factor de transcripción con más detalle más adelante.

#### 2.7.3.2. Runx2 y Nkx3.2

Runx2 (*Runt related transcription factor 2*) forma parte de la familia de factores de transcripción Runt. Este factor se expresa en condrocitos hipertróficos tempranos y promueve la diferenciación hipertrófica (Lefebvre et al, 2005). Runx2 activa la transcripción de *Col10a1*, un marcador de condrocitos hipertróficos, y también activa la expresión de *Ihh* (Yoshida et al, 2004). Por otro lado, PTHrP inhibe la expresión de Runx2, lo que contribuye a que PTHrP inhiba la hipertrofia (Guo et al, 2006). Estos datos indican que Runx2 contribuye al bucle de retroalimentación negativo de Ihh/PTHrP, por lo que tiene un importante papel en mantener el balance entre la proliferación y la hipertrofia. Por otra parte, se ha visto que el factor de transcripción Sox9 reprime la actividad de Runx2 (Zhou et al, 2006; Vega et al, 2004).

Nkx3.2 (*NK3 homeobox 2*) es un miembro de la familia de proteínas NK que contiene un homeodominio en su estructura. Es un factor de transcripción expresado en condrocitos proliferativos y su expresión es dependiente de PTHrP. Nkx3.2 inhibe el paso de diferenciación de los condrocitos a hipertróficos. Además, la sobreexpresión de Nkx3.2 inhibe la expresión de Runx2, y la sobreexpresión de Runx2 contrarresta los efectos de Nkx3.2 en la maduración de los condrocitos (Provot et al, 2006). Todos estos factores están relacionados entre sí y controlan el equilibrio entre proliferación e hipertrofia (Figura 5).



**Figura 5** (Modificada de Mackie et al. 2008): Diagrama esquemático que permite una visión de como los factores que actúan a nivel local interaccionan entre ellos para controlar el balance entre proliferación e hipertrofia. Las flechas indican activación de la ruta, mientras que los extremos romos indican inhibición. Los colores de las flechas y los factores se corresponden.

### 2.7.3.3. Trío de Sox

Se conoce como “trío de SOX” a la combinación de los factores de transcripción Sox5, Sox6 y Sox9. Estas tres proteínas son miembros de la familia de factores de transcripción Sox, que se caracterizan por tener un dominio de unión a ADN del tipo HMG (*High Mobility Group*). Estas proteínas son necesarias para que la condrogénesis se de correctamente, ya que su efecto tiene lugar durante etapas tempranas de este proceso (Akiyama et al, 2011).

Sox9 se expresa en células mesenquimales y en todos los tipos de condrocitos a excepción de los hipertrofos (Wright et al, 1995; Ng et al, 1997; Zhao et al, 1997). Es crítico en el proceso de condensación de células mesenquimales para dar lugar a los condrocitos, ya que en ratones donde Sox9 no es funcional esta diferenciación no ocurre (Bi et al., 1999) y el ratón no puede desarrollar ni cartilago ni hueso (Akiyama et al, 2002). Además controla la expresión de los genes que codifican las proteínas que forman parte de la matriz cartilaginosa, como colágeno tipo-II (Col-II) colágeno tipo-IX (Col-IX), colágeno tipo-XI (Col-XI) y agrecano (Acan) (De Crombrughe et al, 2000). En humanos se ha descrito que la haploinsuficiencia de SOX9, causada por mutaciones en el gen SOX9, es responsable de la displasia campomélica (CMPD, MIM#114290). Esta displasia es una enfermedad letal que está caracterizada por el acortamiento y angulación de las extremidades inferiores, principalmente el fémur, y también sexo inverso en los pacientes masculinos.

Sox5 y Sox6 tienen el mismo patrón de expresión que Sox9 en la placa de crecimiento (Lefebvre et al, 1998). Sox9 es necesaria para la expresión de Sox5 y Sox6, ya que ratones que no expresan Sox9, no son capaces de expresar Sox5 y Sox6 (Akiyama et al, 2002). SOX5 y SOX6

carecen de dominio de transactivación, por lo que no son capaces de activar la transcripción de otros genes por sí mismos, es por ello que se unen a SOX9 formando el trío de SOX. La ausencia de Sox5 o de Sox6 en ratones da lugar a defectos cartilaginosos y óseos muy leves, pero el ratón knock-out doble para los dos genes desarrolla una severa displasia esquelética caracterizada por la ausencia de cartílago, que es debida a defectos en la proliferación y a la ausencia de matriz cartilaginosa (Smits et al, 2001; Lefebvre et al, 2002). Estos datos sugieren una papel importante y mutuamente excluyente de Sox5 y Sox6 en el control del crecimiento (Lefebvre et al, 2002).

Recientemente en nuestro grupo se ha demostrado que SHOX interacciona con SOX5 y SOX6. El conjunto de estos factores junto con SOX9, el trío de SOX, es capaz de unirse al *enhancer* del *agrecano* y activar su expresión, componente esencial de la matriz extracelular cartilaginosa (Aza-Carmona et al, 2011).

## 2.8. La matriz extracelular cartilaginosa

Los condrocitos están embebidos en lagunas en la matriz extracelular cartilaginosa (MEC). Ésta les proporciona apoyo, estabilidad mecánica y capacidad para resistir la presión. Más del 90% del volumen del cartílago pertenece a la MEC. Defectos en la síntesis de algunos de sus componentes dan lugar a problemas en el crecimiento óseo.

La MEC está compuesta por tres clases de moléculas principales:

El componente principal son **los colágenos**, en especial el colágeno tipo-II, pero también los colágenos tipo-IX, -X y -XI. Todos ellos forman fibrillas y son específicos de cartílago (Ross M y Pawlina W). Se han asociado mutaciones en los genes que codifican para los colágenos tipo-II, -IX y -X con defectos en la matriz cartilaginosa, que dan lugar diferentes displasias esqueléticas que cursan con talla baja (Spranger et al, 1994; Horton Jr et al, 1992; Muragaki et al, 1996; Wallis et al, 1996). Por otro lado, los colágenos juegan un importante papel controlando la difusión de factores de crecimiento relacionados con la regulación de la placa de crecimiento, como TGF- $\beta$ .

**Los proteoglucanos** son otro grupo de moléculas que forman parte de la MEC. La proteína principal de este grupo, es el *agrecano*, cuya expresión está regulada por SHOX, como hemos mencionado anteriormente. Los proteoglucanos tienen gran cantidad de grupos sulfato libres, lo que les permite entrecruzarse con los distintos componentes de la MEC y retener las moléculas de agua, confiriendo a la MEC sus propiedades biomecánicas correspondientes. Los defectos en la síntesis de estos proteoglucanos dan lugar a diferentes displasias esqueléticas, la acondrogénesis tipo 1B (ACG1B, MIM#600972) y la atelosteogénesis tipo 2 (AO2, MIM#256050) (Rossi et al, 2001).

**Las integrinas** son las responsables de mediar la interacción entre los condrocitos y las macromoléculas de la MEC que los rodean, dándole más integridad a la placa de crecimiento y mediando la comunicación entre la célula y la matriz (Ruoslahti et al, 1991).

Además de los componentes proteicos mencionados anteriormente, la MEC contiene enzimas remodeladoras de la matriz conocidas como **metaloproteinasas** (MMPs). Los ratones que carecen de estas proteínas o sus inhibidores desarrollan problemas vasculares y de formación ósea (Gerber et al, 1999). Las metaloproteinasas son fundamentales en la degradación y remodelación de la MEC, procesos necesarios para que los condrocitos puedan aumentar de tamaño durante la hipertrofia, que el frente de osificación pueda avanzar, y que se pueda dar el proceso de angiogénesis (Ortega et al, 2003). Para que estos procesos tengan lugar han de degradarse principalmente el colágeno tipo-II y el agrecano.

Un tipo de metaloproteinasas es la familia de agrecanasas ADAMTS (*A Desintegrin And Metalloproteinase with Trombospondin motifs*) (Cawston et al, 2006). Se ha visto que la falta de algunas de estas enzimas en ratones (ADAMTS-1, -4 o -5) no da lugar a ningún defecto en el crecimiento (Little et al, 2005; Stanton et al, 2005), lo que puede deberse a que su función es redundante o a que la degradación del agrecano no es tan crucial como la del colágeno. Además, en la MEC también se encuentran las proteínas ADAMTSL (*A Desintegrin And Metalloproteinase with Trombospondin motifs-Like*) que, a pesar de presentar una estructura muy similar a la de las enzimas ADAMTS, carecen del dominio proteasa y por lo tanto se desconoce su función. A pesar de ello, se ha descrito que mutaciones en *ADAMTSL2* causan la displasia geleofísica, un tipo de displasia esquelética (Le Goff et al, 2008).

### 3. SHOX

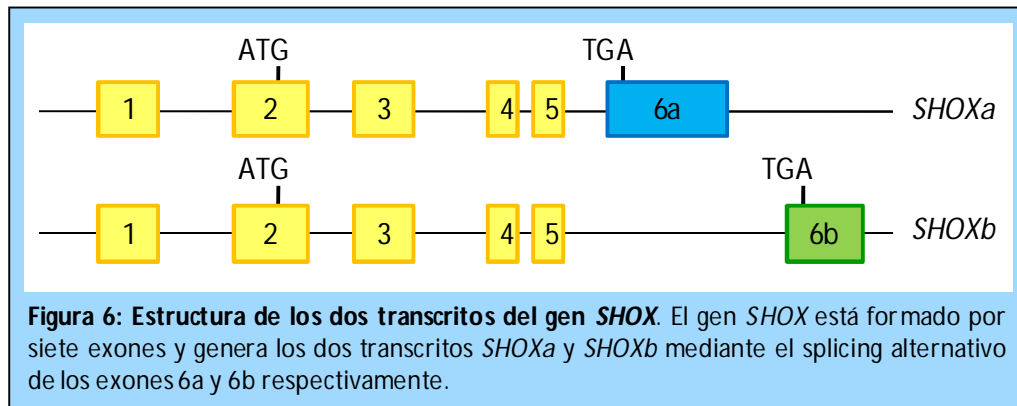
#### 3.1. El gen *SHOX*

El gen *SHOX* (*Short stature homeobox containing gene*) está localizado en la región pseudoautosómica 1 (PAR1), localizada en el brazo corto de los cromosomas sexuales X e Y. Esta región escapa a la inactivación del cromosoma X, por lo que los genes que están contenidos en ella son expresados por ambos cromosomas sexuales y por ello, todos los individuos sanos, hombres y mujeres, contienen dos copias activas de *SHOX*.

El gen *SHOX* abarca unas 40 Kb de ADN genómico y está formado por 7 exones. Da lugar a dos transcritos principales diferentes, *SHOXa* y *SHOXb*, mediante el *splicing* alternativo de sus dos últimos exones 6a y 6b (Rao et al, 1997; Ellison et al, 1997) (Figura 6). Estos transcritos generan las dos isoformas, *SHOXa* y *SHOXb*, de 292 y 225 aminoácidos, respectivamente.

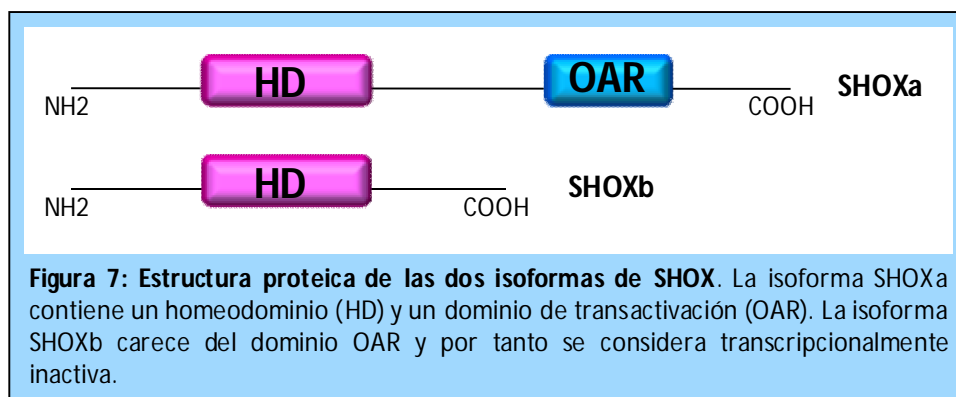


El gen *SHOX* está presente en todos los vertebrados con la notable excepción de roedores, rana y conejo (Clement-Jones et al, 2000).



### 3.2. La proteína SHOX

*SHOXa* contiene dos dominios bien diferenciados en su estructura, el homeodominio (HD) que está codificado por el motivo *homeobox* y el dominio OAR que está formado por 14 aminoácidos y se encuentra en la región C-terminal de algunas proteínas con homeodominio (Figura 7). El dominio OAR está considerado como un dominio necesario para la transactivación, ya que alteraciones en su secuencia modifican la capacidad transcripcional de la proteína que lo contiene (Rao et al, 1997; Ellison et al, 1997). Mediante el homeodominio, *SHOX* es capaz de unirse a secuencias específicas del ADN (Decker et al, 2011; Marchini et al, 2007), interactuar con otras proteínas (Aza-Carmona et al, 2011) y trasladarse al núcleo, gracias a una señal de localización nuclear de cinco aminoácidos contenida en dicho dominio (Sabherwal et al, 2004a). Se considera a *SHOXa* como la forma transcripcionalmente activa, ya que contiene ambos dominios en su estructura, mientras que la isoforma *SHOXb* carece del dominio de transactivación, por lo que se considera inactiva en cuanto a su capacidad transcripcional, desconociéndose su función (Figura 7).



SHOX pertenece a la familia de factores de transcripción *homeobox* de tipo *paired* (Rao et al, 2001). La región del homeodominio está formada por tres hélices que forman el motivo hélice-giro-hélice mediante el cual se unen al ADN por su hendidura mayor (Gehring et al, 1994; Wilson et al, 1995). Dentro de la clase *paired*, SHOX pertenece a la subclase Q50 debido a que contiene una glutamina en la posición 50 de su homeodominio. Está descrito que los miembros de la subclase Q50 se unen de manera preferente a la secuencia palindrómica consenso (5'-TAATNNNATTA-3'), también conocida como elemento P3 (Rao et al, 2001), aunque también puede unirse a elementos P4, P5 y P6 (con 4, 5 ó 6 nucleótidos en el interior de la secuencia palindrómica, respectivamente), pero en los últimos años se ha sugerido que SHOX también se puede unir tanto a secuencias palindrómicas imperfectas (Marchini et al, 2007), como a secuencias ricas en adeninas y timinas (Decker et al, 2011). SHOXa se une al ADN en forma de homodímero preferentemente, aunque también puede hacerlo como monómero (Rao et al, 2001). Además, las diferentes isoformas de SHOX, SHOXa y SHOXb, son capaces de homo y heterodimerizar entre ellas (datos no publicados). Asimismo, existe un parálogo de SHOX en humanos, SHOX2, que tiene una homología con SHOX del 83% a nivel de proteína y un homeodominio idéntico, por lo que se piensa que puede estar implicado en la regulación de los mismos genes que SHOX (Blaschke et al, 1998; Semina et al, 1998). SHOX2 está presente en todas las especies de vertebrados a excepción del perro (Clement-Jones et al, 2000).

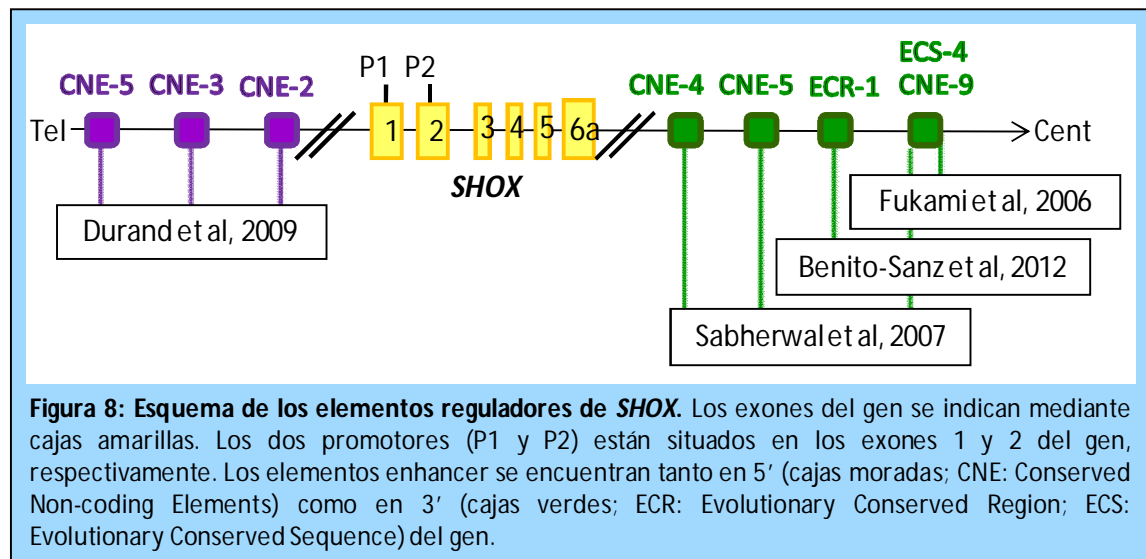
### 3.3. Regulación de SHOX

La expresión de SHOX está controlada a nivel transcripcional y traduccional mediante la existencia de dos promotores alternativos que generan dos extremos 5'UTR distintos en el mismo transcrito, dando lugar a diferencias en su eficiencia traduccional (Blaschke et al, 2003) (Figura 8). Los dos promotores están localizados en el exón 1 y en el exón 2 de *SHOX*. De ellos, el que reside en el exón 2 es el principal, ya que la eficiencia traduccional del transcrito que genera es mayor.

Además, en estos últimos años, diferentes grupos, entre ellos el nuestro, han identificado siete elementos *enhancers* que regulan la expresión del gen *SHOX*, tres en 5' (Durand et al, 2010) y cuatro en 3' del gen (Fukami et al, 2006; Sabherwal et al, 2007; Benito-Sanz et al, 2012).

Recientemente, Durand y colaboradores han descrito al factor de transcripción HOXA9 como el primer regulador aguas arriba de *SHOX* (Durand et al, 2012). Se ha demostrado que HOXA9 se une a una secuencia rica en AT localizada en el segundo promotor de *SHOX*. Esta unión provoca la activación de la expresión de SHOX en células U2OS, y su represión en cultivos de micromasas de pollo. La familia *HOX* es una de las principales familias de genes implicadas en desarrollo embrionario. Codifican distintos factores de transcripción implicados en la regulación de la

morfogénesis y la diferenciación celular durante el desarrollo embrionario, especialmente en la formación de las extremidades (Zakany et al, 2007).



### 3.4. Expresión de SHOX

SHOX se expresa en corazón, músculo esquelético, placenta, páncreas, hígado y células osteogénicas (Ellison et al, 1997, Rao et al, 1997). Durante el desarrollo embrionario humano, SHOX se localiza en las extremidades en formación, en concreto en la región media de los miembros en desarrollo, perfilando el pre-cartilago del hueso. Además, la expresión de SHOX también se detecta en el primer y segundo arco faríngeo del embrión humano (Clement-Jones et al, 2000).

Dentro de la placa de crecimiento humana se ha detectado una expresión relativamente fuerte de SHOX en condrocitos hipertróficos de la placa de crecimiento puberal, y en condrocitos de reserva, proliferativos e hipertróficos en la placa de crecimiento fetal (Marchini et al, 2004; Munns et al, 2004; Aza-Carmona et al, 2011).

En cuanto a SHOX2, su expresión en hueso se detecta en las extremidades superiores hacia la región media y proximal (Yu et al, 2007). El ratón *knock-out* condicional de *Shox2* durante el desarrollo de condrocitos muestra un acortamiento rizomélico de las extremidades (Bobick y Cobb, 2012). Se ha demostrado que la expresión de SHOX y SHOX2 se solapa en la región media de los miembros de forma específica en cuanto al momento del desarrollo (Clement-Jones et al, 2000).

### 3.5. Función de SHOX en el crecimiento óseo

SHOX, como cualquier otro factor de transcripción, se une a regiones concretas del genoma para regular la expresión de ciertos genes. Hasta el momento se han identificado tres genes cuya expresión está regulada por SHOX: *NPPB* (Marchini et al, 2007), *ACAN* (Aza-Carmona et al, 2011) y *FGFR3* (Decker et al, 2011).

En 2007, Marchini y colaboradores identificaron la primera diana de transcripción de SHOX, el péptido precursor natriurético tipo B (*NPPB*, MIM#600295) y demostraron que SHOX transactiva su promotor. *NPPB* está localizado en la región cromosómica 1p36 y codifica el péptido natriurético cerebral (BNP o *Brain Natriuretic Peptide*). BNP es conocido principalmente por su función como marcador biológico para el diagnóstico y pronóstico de enfermedades cardiovasculares (Suzuki et al, 2004; Kragelund et al, 2005). Además de su función cardiovascular, hay evidencias que indican que los péptidos natriuréticos BNP y CNP (Péptido Natriurético de tipo C o *C-type Natriuretic Peptide*), y sus receptores (NPRs), son importantes reguladores de la osificación endocondral del hueso. Ratones que sobreexpresan o tienen deficiencia de estos péptidos natriuréticos o sus receptores, desarrollan importantes defectos esqueléticos (Jaubert et al, 1999; Chusho et al, 2000; Yasoda et al, 2004). Además, se han descrito mutaciones en heterocigosis de *NPR-B* (receptor del péptido natriurético B) en casos de displasia acromesomélica tipo Maroteaux (AMDM, MIM#602875) (Bartels et al, 2004).

El gen *ACAN*, codificante del agrecano, fue identificado como diana transcripcional de SHOX por nuestro grupo. Se ha demostrado que SHOX interacciona con los factores de transcripción SOX5 y SOX6, que junto con SOX9 forman el trío de SOX. Esta interacción activa el *enhancer* de agrecano, el cual es un componente fundamental del cartilago (Aza-Carmona et al, 2011).

El gen *FGFR3* ha sido la última diana de transcripción de SHOX identificada hasta el momento (Decker et al, 2011). En este trabajo demostraron que SHOX activa la expresión de *FGFR3* en células de osteosarcoma humano U2OS, y que la reprime en cultivos de micromasa de pollo. Este gen codifica el receptor de membrana FGFR3, cuya función es interaccionar con factores de crecimiento extracelulares para la transducción de señales hacia el interior celular. Está implicado en el control de la osificación y mutaciones en el mismo son responsables de distintas displasias esqueléticas (ver sección 2.7.2.1).

Recientemente hemos demostrado que SHOX2 también regula la expresión de *NPPB* directamente y de *ACAN* indirectamente mediante la interacción con el trío de SOX (Aza-Carmona et al, en prensa; Aza-Carmona et al, 2011). En cambio, SHOX2 aparentemente no regula la expresión de *FGFR3* (Decker et al, 2011). Por tanto, hipotetizamos que podría existir una

redundancia funcional entre SHOX y SHOX2 en el hueso específica de región y momento del desarrollo (Aza-Carmona et al, en prensa).

Con respecto a la posible función de SHOX durante el desarrollo esquelético, se ha visto que su sobreexpresión bloquea el ciclo celular de los condrocitos deteniendo la proliferación y fomentando su apoptosis (Marchini et al, 2004). Por otro lado, se sabe que los genes que presentan el dominio *homeobox* juegan un papel importante durante la embriogénesis y el desarrollo, regulando patrones de expresión espacio-temporales.

El conjunto de estos datos sugiere un papel de SHOX en el desarrollo morfológico del esqueleto (Clement-Jones et al, 2000) y en la condrogénesis (Marchini et al, 2004; Munns et al, 2001; Aza-Carmona et al, 2011; Decker et al, 2011), quizá promoviendo la diferenciación de los condrocitos hacia la hipertrofia en la placa de crecimiento (Marchini et al, 2004).

### **3.6. Patologías asociadas al gen SHOX**

El gen *SHOX* fue identificado y vinculado con la talla baja a finales de los 90 por dos grupos independientes, en un paciente con talla baja idiopática (TBI, MIM#300582) y una paciente con síndrome de Turner (MIM#309585) (Rao et al, 1997; Ellison et al, 1997). Con respecto al síndrome de Turner (X0), las características principales son talla baja, piel del cuello ondulada, desarrollo sexual retardado o ausente y problemas cardíacos, entre otras posibles manifestaciones. La causa de la presencia de talla baja en estas pacientes es la falta de una copia de *SHOX* debida a la pérdida total o parcial del cromosoma X.

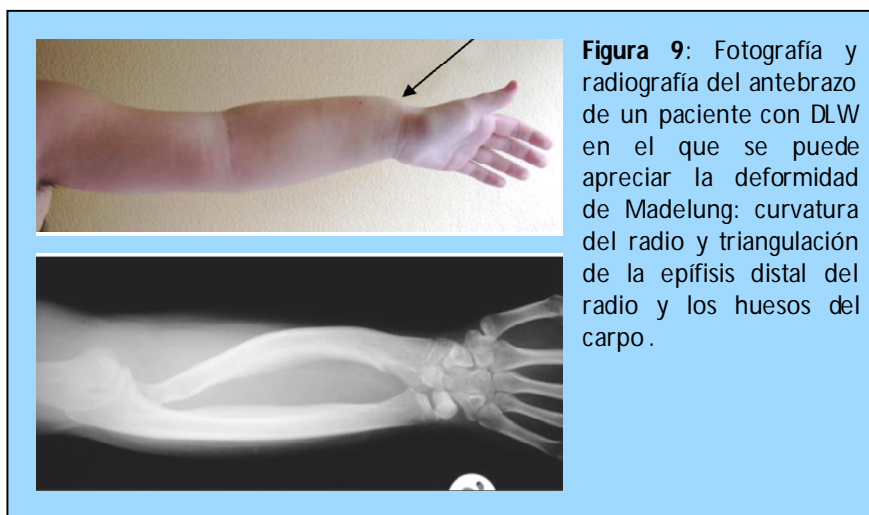
Las patologías que han sido asociadas al gen *SHOX* se deben a la haploinsuficiencia o ausencia de SHOX, y son la discondrosteosis de Léri-Weill (DLW, MIM#127300) y una pequeña proporción de pacientes con talla baja idiopática (TBI), así como la displasia mesomélica de Langer (DML, MIM#249700) por deficiencia completa de SHOX, respectivamente.

Con respecto a *SHOX2*, hasta el momento no hay ninguna patología que se haya asociado con defectos en este gen.

#### **3.6.1. La discondrosteosis de Léri-Weill (DLW)**

La discondrosteosis de Léri Weill (DLW) es una displasia esquelética que fue descrita por A. Leri y J. Weill en 1929 y afecta aproximadamente a 1 de cada 1000 nacimientos (Nicolosi et al, 2010).

Se caracteriza por una talla baja desproporcionada, ya que se debe a un acortamiento tan solo mesomérico (del segmento medio) de los brazos y las piernas. También suelen desarrollar la deformidad de Madelung en la muñeca, que está caracterizada por una curvatura del radio y triangulación de la epífisis distal del radio y los huesos del carpo (Figura 9). Otras características que pueden presentar los pacientes son: hipertrofia muscular, anomalías en el codo, escoliosis, paladar hendido y exostosis. La inteligencia de estos pacientes es normal. La severidad de la DLW es variable entre los pacientes, y suele ser más grave en las mujeres. La variabilidad fenotípica de los pacientes diagnosticados con DLW es muy alta, incluso en miembros de una misma familia, debido a que no todos los pacientes presentan talla baja o la deformidad de Madelung, características propias de esta displasia esquelética.



**Figura 9:** Fotografía y radiografía del antebrazo de un paciente con DLW en el que se puede apreciar la deformidad de Madelung: curvatura del radio y triangulación de la epífisis distal del radio y los huesos del carpo.

La DLW se hereda de forma pseudoautosómica dominante, ya que un alelo alterado de *SHOX* es suficiente para que el paciente desarrolle la displasia. Esta alteración causa la haploinsuficiencia de *SHOX* y puede ocurrir por defectos en el propio gen, deleciones o duplicaciones parciales o completas del mismo o mutaciones puntuales, (Shears et al, 1998; Belin et al, 1998; Benito-Sanz et al, 2011), pero también por deleciones de sus elementos *enhancers* situados en el flanco 3' del gen (Benito-Sanz et al, 2005; Chen et al, 2009).

No hay una relación genotipo-fenotipo, ya que la severidad de la displasia no se corresponde con la longitud de las deleciones ni con una mutación puntual en concreto. De hecho, hay casos de miembros familiares con la misma alteración molecular y un fenotipo muy diferente (Grigeliuniene et al, 2001).

De los pacientes diagnosticados con DLW, un 70% aproximadamente tienen alteraciones en el gen *SHOX* o sus *enhancers*, es decir, que todavía existe un 30% aproximadamente de pacientes cuya causa molecular es desconocida. Es por ello, que nos planteamos que debería de haber otros

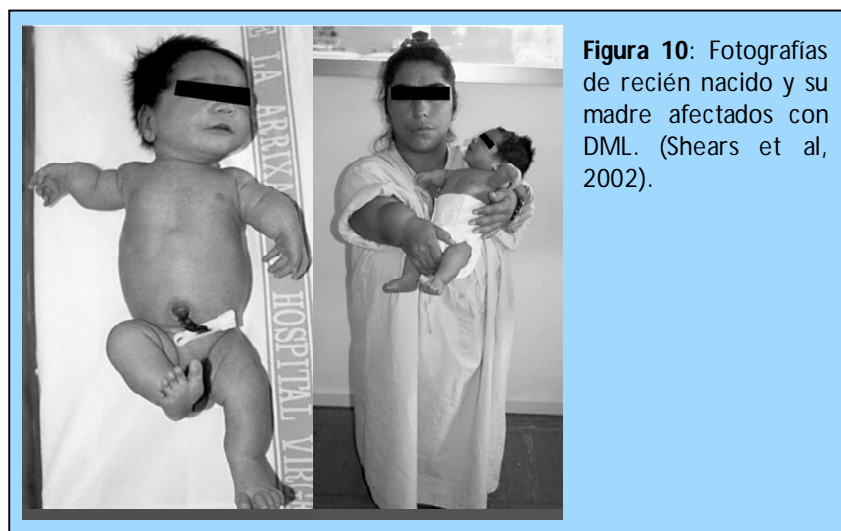
*loci* implicados en esta patología, y los genes regulados por *SHOX* son candidatos a ser los genes responsables de la DLW en este 30% de pacientes que no tienen alteraciones en el gen *SHOX* o sus *enhancers*.

### 3.6.2. La displasia mesomélica de Langer (DML)

La displasia mesomélica de Langer (DML) es la forma más severa de DLW. Fue descrita por el Dr. Langer en 1967. Su incidencia es desconocida, pero hasta la fecha no se han descrito más de 80 casos en el mundo, con mayor incidencia en poblaciones con alto grado de consanguinidad.

Se caracteriza por una talla baja desproporcionada muy severa causada por el acortamiento de los miembros superiores e inferiores. Este acortamiento es tanto mesomélico como rizomélico (del segmento proximal). La consecuencia de estas características es que los pacientes presenten enanismo, con una talla de -9 a -6 desviaciones estándar (DE) (Figura 10). Los defectos óseos que presentan estos pacientes son: un cúbito y peroné muy poco desarrollados o incluso ausentes, y el radio y la tibia inusualmente cortos, gruesos y curvados. A diferencia de la DLW, la deformidad de Madelung no es un rasgo común en pacientes con DML. La inteligencia de estos pacientes es normal.

La DML se hereda de forma pseudoautosómica recesiva, ya que ambos alelos han de tener una alteración en *SHOX* o sus *enhancers* para causar esta displasia. Por lo tanto, estos pacientes no presentan ninguna copia funcional del gen *SHOX*. Las alteraciones que se dan tanto en *SHOX* como en sus regiones reguladoras son las mismas que causan la DLW y ocurren en homocigosis o heterocigosis compuesta (Zinn et al, 2002; Campos-Barros et al, 2007; Bertorelli et al, 2007).



### 3.6.3. Talla Baja Idiopática (TBI)

En 2008, Cohen y colaboradores propusieron un consenso en la definición de TBI: la talla baja idiopática se define como una condición en la cual la talla de los individuos está por debajo de -2 DE con respecto a edad, sexo y grupo poblacional, en los que no se ha identificado ningún trastorno sistémico, endocrino, nutricional o cromosómico responsable (Cohen et al, 2008).

Este grupo de pacientes tan heterogéneo se puede dividir en niños cuya estatura es menor de lo esperado con respecto a la estatura de sus padres, y niños con talla baja familiar, en los que el fenotipo de talla baja se va heredando de generación en generación.

Está descrito que alrededor de un 4.2% de los individuos con TBI tienen un defecto en *SHOX* o en sus elementos reguladores (Chen et al, 2009). Las alteraciones identificadas en *SHOX* en los pacientes con TBI son las mismas que las que se encuentran en pacientes con DLW o DML, a diferencia de una delección en el flanco distal 5' de *SHOX* que incluye los enhancers CNE-2 y CNE-3, que solamente se ha identificado en una familia con TBI (Benito-Sanz et al, 2012).

### 3.7. Búsqueda de nuevos genes regulados por SHOX (Antecedentes)

A pesar de estos datos y de la identificación de tres dianas de transcripción reguladas por SHOX, su implicación en la regulación del crecimiento óseo y las cascadas de señalización en las que puede estar implicado dentro del hueso, son aún desconocidas. Es por ello que nuestro grupo llevó a cabo, en colaboración con Dr. Claes Wadelius (Uppsala University, Suecia), un ensayo de inmunoprecipitación de cromatina y posterior análisis mediante arrays (ChIP-on-Chip) en células de osteosarcoma humano (U2OS). El objetivo de este ensayo fue identificar nuevas posibles dianas de transcripción de SHOX. Los resultados permitieron observar que SHOX se une a un gran número de secuencias, incluyendo 347 de genes conocidos. De todas ellas se buscaron aquellas que se corresponden con genes que están relacionados con el crecimiento óseo y que se expresan en el hueso. Además se descartaron las regiones que no estaban conservadas filogenéticamente. Tras esta criba se decidió continuar con el análisis de dos regiones contenidas en los genes *ADAMTSL3* (*ADAMTS-like protein 3*, MIM 609199) y *HMGA2* (*high mobility group AT-hook 2*, MIM 600698).

En la tabla 3 se indican los resultados obtenidos para el experimento de ChIP on Chip, donde se puede observar que las regiones del intrón 3 de *ADAMTSL3* e intrón 1 de *HMGA2* están enriquecidas en presencia de SHOX (Tabla 3). Estos resultados se validaron mediante una PCR cuantitativa de la cromatina inmunoprecipitada con el anticuerpo contra SHOX y contra HA utilizando sondas específicas de las regiones de estudio, una técnica diferente al ChIP on Chip



(Tabla 3). La IP utilizando el anticuerpo contra la inmunoglobulina G (IgG) representan el ruido del experimento, es decir, lo que se inmunoprecipita de manera inespecífica.

				Significado
	Localización	Chr15: 82192305-82193522	Chr12:64506898-64507222	
	Gen	<i>ADAMTSL3</i>	<i>HMGA2</i>	
ChIP on Chip	log2 (array)	2,23	1,17	
Anticuerpos - Inmunoprecipitaciones de cromatina	SHOX	27,60	6,96	Factor de transcripción en estudio
	HA	21,48	NR	Réplica de SHOX (HA unido a SHOX)
	IgG	3,65	0,82	Control negativo
	Pol2	1,92	2,36	Genes transcripcionalmente activos
	H3K4Me3	4,5	4,1	Regiones reguladoras promotoras
	H3K27Me3	3,2	1,7	Genes reprimidos
	H3K4Me1	1,1	0,2	Regiones reguladoras distales
	H3ac	2,1	5,7	Regiones reguladoras promotoras
	H4ac	2,5	1,0	Cromatina remodelada

**Tabla 3: Resultados de los experimentos de ChIP on Chip e inmunoprecipitaciones realizados en células U2OS.** En la tabla se indican los resultados del experimento de ChIP on Chip (log2 (array)) que se llevaron a cabo por triplicado utilizando el anticuerpo contra SHOX. Un valor superior a 1 indica que la región de estudio está enriquecida en SHOX. En los resultados de las inmunoprecipitaciones de cromatina se indica el anticuerpo utilizado y su significado biológico correspondiente (Akan et al, 2009). Estos datos están normalizados frente a regiones negativas del genoma. NR: No Realizado

Por otro lado, se repitieron las inmunoprecipitaciones de cromatina y posteriores PCRs cuantitativas utilizando anticuerpos contra distintas histonas modificadas que proporcionan información sobre el ambiente epigenético en el que se encuentran las regiones a estudio, lo que se conoce como “código de histonas” (Akan et al, 2009; Jenuwein and Allis et al, 2001).

La primera secuencia genómica seleccionada mediante el ensayo de ChIP on Chip se encuentra en el intrón 3 del gen *ADAMTSL3*. Este gen codifica una glicoproteína, *ADAMTSL3* o Punctin-2, que se secreta a la matriz extracelular (Hall et al, 2003), y aunque no se conoce su función, cuatro estudios GWAS independientes (Estudios de Asociación en el Genoma Completo) han relacionado tres SNPs, contenidos en dicho gen, con la estatura en humanos (Lettre et al, 2008; Weedon et al, 2008; Sovio et al, 2009; Liu et al, 2010). Además, se han identificado mutaciones en el gen *ADAMTSL2*, proteína que pertenece a la misma familia que *ADAMTSL3*, como responsables de la displasia geleofísica (GPHYSD1, MIM#231050), caracterizada por baja estatura y deformidades esqueléticas (Le Goff et al, 2008).

La segunda secuencia genómica seleccionada se localiza en el intrón 1 del gen *HMGA2*. El gen *HMGA2* codifica la proteína HMGA2, que se une a secuencias específicas del genoma para controlar la transcripción de ciertos genes implicados en proliferación y desarrollo (Cleyneen and Van de Ven et al, 2008). Su implicación en el crecimiento óseo se puso de manifiesto mediante

varios estudios GWAS, que relacionaron distintos SNPs en el gen (Weedon et al, 2007; Lettre et al, 2008; Weedon et al, 2008; Sanna et al, 2008; Gudbjartsson et al, 2008; Soranzo et al, 2009; N'Diaye et al, 2011; Carty et al, 2012) y una repetición de dos nucleótidos en el 5'UTR (Hodge et al, 2009) con la estatura. Además el ratón *knock-out* para este gen tiene fenotipo "pigmeo" (Zhou et al, 1995), mientras que el ratón trasgénico en los exones 1-3 produce gigantismo (Battista et al, 1999). Por otro lado, se ha encontrado que una delección intragénica en el gen HMGA2 da lugar a un fenotipo con baja estatura (Buysse et al, 2009), mientras que una inversión pericéntrica da lugar a un fenotipo de sobrecrecimiento (Ligon et al, 2005).

Con estos datos como punto de partida, se procedió a confirmar y caracterizar a *ADAMTSL3* y *HMGA2* como nuevas posibles dianas de transcripción de SHOX, objetivo principal de la presente Tesis Doctoral.

## HIPÓTESIS



La presencia de talla baja y deformidades esqueléticas en pacientes con discondrosteosis de Léri-Weill (DLW) se debe a la haploinsuficiencia de SHOX. De los pacientes diagnosticados con DLW, el 70% aproximadamente presentan un defecto molecular en el gen *SHOX* o sus secuencias reguladoras (*enhancers*). La existencia de un 30% de pacientes sin defectos moleculares en *SHOX* o sus *enhancers*, sugiere la existencia de otros genes, regiones o *loci* implicados en esta patología. Estos nuevos *loci*, aún desconocidos, podrían ser otros genes regulados por SHOX al nivel transcripcional. Es por ello, que en nuestro grupo se llevó a cabo un ensayo de inmunoprecipitación de cromatina y posterior análisis en arrays (ChIP on Chip) para identificar genes a los que SHOX se une y podría regular. Así, tras la criba de los datos obtenidos, se seleccionaron los genes *ADAMTSL3* y *HMGA2* como candidatos a estar regulados por SHOX a nivel transcripcional. La confirmación de estos genes como dianas de transcripción de SHOX abriría la posibilidad de que mutaciones en ellos explicaran los defectos moleculares responsables de la DLW en el 30% de pacientes que no tienen defecto molecular conocido. Además, abriría nuevos caminos para entender las vías de señalización en las que SHOX participa y con ello, profundizar en el conocimiento del complejo proceso de la regulación del crecimiento óseo, lo que podría ayudar a identificar nuevas dianas terapéuticas para las enfermedades asociadas.



## OBJETIVOS





1. Confirmación y caracterización de los genes *ADAMTSL3* y *HMGA2* identificados anteriormente mediante el ensayo de ChIP-on-Chip, como nuevas dianas de transcripción de *SHOX*, tratando de comprender su implicación en la regulación del crecimiento óseo.

2. Búsqueda de mutaciones en los genes *ADAMTSL3* y *HMGA2* en pacientes con DLW y TBI sin mutaciones en el gen *SHOX* o sus reguladores en *PAR1*.



## **MATERIALES Y MÉTODOS**



## 1. LÍNEAS CELULARES Y MEDIOS DE CULTIVO

U2OS (*Human Bone Osteosarcoma Epithelial Cells*): Es una línea celular de osteosarcoma humano que proviene de un sarcoma de tibia de una mujer de 15 años de edad. Estas células se cultivan en un medio compuesto por D-MEM (Invitrogen) suplementado con 10% SFB (Suero Fetal Bovino – Invitrogen) y 1% de antibióticos penicilina/streptomycin (Invitrogen).

HEK293 (*Human Embryonic Kidney 293 Cells*): Esta línea proviene de células embrionarias de riñón humanas que se transformaron mediante adenovirus. Se cultivan en el mismo medio que la línea celular U2OS.

C3H/10T1/2: Es una línea de células mesenquimales de embrión de ratón. Estas células son muy sensibles a la inhibición de la división post-confluencia. Se cultivan en un medio compuesto por *Eagles Basal Medium* (Invitrogen), suplementado con 2mM de L-Glutamina (Invitrogen), 0.15% de bicarbonato sódico (Sigma Aldrich), 10% de SFB y 1% de antibióticos penicilina/streptomycin.

HEK293-ADAMTS10-FLAG: Es una línea celular HEK293 transfectada estable con el vector de expresión pCDNA3.1 que contiene el ADNc de ADAMTS10 unido a la proteína FLAG en su extremo C-terminal (línea celular donada por el Dr. Suneel Apte, Cleveland Clinic, Ohio, EEUU). Esta línea celular se cultiva en el mismo medio que las líneas U2OS y HEK293, pero suplementado con 1mg/ml del antibiótico G418 (Invitrogen) para mantener la selección.

En general, los experimentos llevados a cabo en la presente Tesis Doctoral, se han desarrollado en la línea celular U2OS porque ha servido para identificar ciertas funciones de SHOX, como sus dianas de transcripción o cofactores con los que interactúa, por otros grupos y el nuestro (Marchini et al, 2007; Aza-Carmona et al, 2011; Decker et al, 2011).

## 2. CONSTRUCCIÓN DE LOS PLÁSMIDOS

### 2.1. pHA-SHOXa

Contiene la secuencia de *SHOXa* desde el codón de translación inicial hasta el de terminación (NM\_000451) junto con el péptido señal HA (Aza-Carmona et al, 2011).

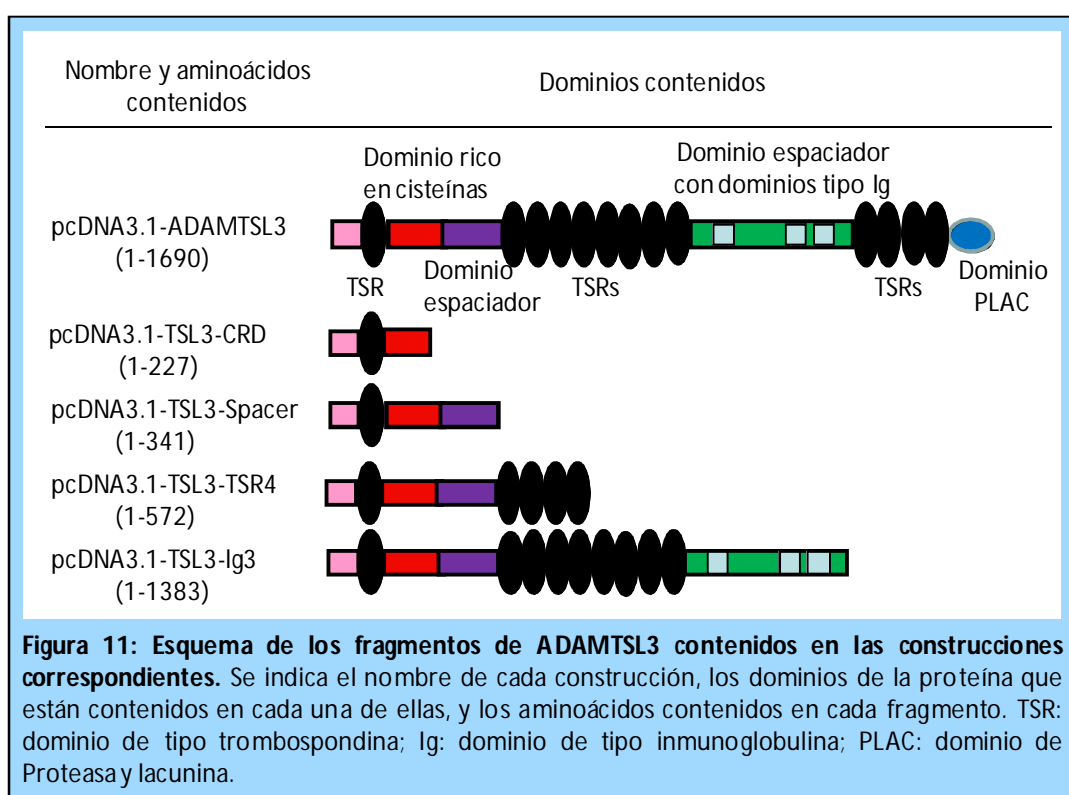
### 2.2. pHA-SOX5, pHA-SOX6. y pHA-SOX9

El clon de *SOX5* ha sido donado por el Dr. S. Ikewaga y corresponde a la isoforma B de L-*SOX5*, secuencia NM\_152989. El clon de *SOX6* ha sido donado por el Dr. T. Ikeda, y corresponde a una variante de *splicing* sin el exón 9 y con el exón 14a que representa la isoforma predominante

en condrocitos (Cohen-Barak et al, 2001). El clon de *SOX9* contiene su cDNA desde su codón de inicio hasta el de terminación (NM\_000346) (Aza-Carmona et al, 2011).

### 2.3. pcDNA3.1-*ADAMTSL3*, -*ADAMTS10* y fragmentos de *ADAMTSL3*

Estos plásmidos han sido donados por el Dr. Suneel Apte (Cleveland Clinic, Ohio, EEUU). Contienen el ADNc de *ADAMTSL3* (NM\_207517.2) o sus fragmentos (Figura 11) y de *ADAMTS10* (NM\_030957.2) desde su codón de inicio (+1) hasta el de terminación (+1103). En estos plásmidos, *ADAMTSL3* se expresa junto con el péptido señal Myc, mientras que *ADAMTS10* se expresa junto a FLAG.



### 2.4. Clonación del intrón 3 de *ADAMTSL3* y del intrón 1 de *HMGA2*

*ADAMTSL3*: En el primer paso se amplifica el fragmento del intrón 3 de *ADAMTSL3* que dio positivo en el ensayo de ChIP-on-Chip (GRCh37; Cromosoma 15: 84401925-84402160) y parte de su secuencia flanqueante (1542 pb) (GRCh37; Cromosoma 15: 84401168-84402710). Los oligonucleótidos utilizados son: 5'-GAGCTCGCTTCCTTTGTCAGTTCAAAAC-3' y 5'-CTCGAGCCTATACG CCACTCCAGATG-3', que contienen en su secuencia las dianas de las enzimas de restricción *SacI* y *XhoI* respectivamente (subrayadas). Las condiciones de PCR son: 1x PCR Buffer II (Applied Biosystems), 2.5 mM MgCl<sub>2</sub> Solution (Applied Biosystems), 10% de DMSO, 2U de AmpliTaq Gold (Applied Biosystems), 0.2 mM de dNTPs (Roche), 0.4 μM de cada oligonucleótido y

100 ng de ADN, todo ello en un volumen final de 50 µl. Las condiciones de amplificación son: 95°C de desnaturalización durante 10 min, 35 ciclos de: 95°C durante 30 segundos, 57°C durante 1 minuto y 72°C durante 1 minuto y 30 segundos, y por último una extensión final de 8 minutos a 72°C.

*HMGA2*: Para la clonación del fragmento del intrón 1 de *HMGA2* que dio positivo en el ensayo de ChIP-on-Chip (GRCh37; Cromosoma 12: 66220740-66220920) y parte de sus regiones flanqueantes (1564 pb) (GRCh37; Cromosoma 12: 66219421-66220985), los oligonucleótidos utilizados son: 5'-ATACCGGAGCTCCCTCGGACTTTCGCTATTGTG-3' y 5'-GATCGGCTCGAGAGGAATG GAGTGTCTGGGAAT-3', que contienen en su secuencia las dianas de las enzimas de restricción *SacI* y *XhoI* respectivamente (subrayadas). Las condiciones de PCR son: 1x PCR Buffer (Qiagen), 0,5 mM MgCl<sub>2</sub> adicional (Qiagen), 5% de DMSO, 1U de HotStartTaq (Qiagen), 0.3 mM de dNTPs (Roche), 0.4 µM de cada oligonucleótido y 100 ng de ADN, todo ello en un volumen final de 25 µl. Las condiciones de amplificación son: 95°C de desnaturalización durante 15 min, 37 ciclos de: 95°C durante 40 segundos, 65°C durante 40 segundos y 72°C durante 1 minuto, y por último una extensión final de 8 minutos a 72°C.

Los siguientes pasos son comunes tanto para la clonación de *ADAMTSL3*, como para *HMGA2*. Estos fragmentos se introducen en el vector pCR2.1 mediante el kit "TA cloning Dual promoter" (Invitrogen). Para ello se comprueba mediante un gel de agarosa el tamaño de los productos amplificados y se determina su cantidad. A continuación, estos fragmentos se ligan con el vector pCR2.1 en una proporción inserto:vector de 3:1, usando la enzima T4 DNA ligasa (Invitrogen), y se incuban toda la noche a 14°C. Al día siguiente, se transforman células *E. coli* competentes HB101 (Promega) con 6 µl de cada mezcla de ligación mediante un choque térmico a 42°C durante 35 segundos. Las células se resuspenden en 250 µl de LB (triptona 1% - Panreac, extracto de levadura 0,5% - Panreac, NaCl 1% - Sigma Aldrich, Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.25% - Sigma Aldrich) y se incuban durante una hora a 37°C. Después se siembran en placas de LB con agar al 1.5% (Panreac), ampicilina a 50 µg/ml (Sigma) y 40 µl de X-Gal (disuelto en N,N-dimetilformamida a 40 µg/ml) por placa. Estas placas se incuban durante toda la noche a 37°C. De las colonias crecidas en la placa, se seleccionan algunas de las blancas (que contienen los insertos) y se crecen durante la noche en un cultivo de 8 ml de medio LB con ampicilina 100 µg/ml. Al día siguiente se extrae el ADN de los plásmidos empleando el kit "Jetquick Plasmid Miniprep Spin Kit" (GenyCell Biotech). Para comprobar que no se ha introducido ningún error en la secuencia original, se secuencian los plásmidos usando el terminador BigDye V3.1 (Applied Biosystems) y se analizan los resultados con el programa Sequencher 5.10 (Gene Codes).

### 2.4.1. Subclonación del intrón 3 de *ADAMTSL3* y del intrón 1 de *HMGA2*

En la subclonación de estos fragmentos, los insertos se pasan del vector pCR2.1 a los vectores pGL3 Basic, Enhancer y Promotor (Promega). Estos vectores tienen una secuencia similar, en la que el inserto se clona delante del gen reportero de la luciferasa, pero se diferencian en la presencia o ausencia de las secuencias promotoras o *enhancer* de SV40, y por lo tanto, en qué tipos de actividad reguladora podremos detectar con cada uno de ellos (Tabla 1).

Para llevar a cabo la subclonación, las construcciones realizadas en el vector pCR2.1 y los vectores de interés en los que se quieren subclonar (pGL3Basic/Enhancer/Promotor), se digieren con las enzimas cuyas dianas se incorporaron en la PCR, *SacI* y *XhoI* (Takara). Los productos de las digestiones se separan en un gel de agarosa y las bandas que corresponden a los insertos y los vectores digeridos se cortan y purifican con el kit "Gel extraction" (Genycell). A continuación se ligan los insertos con los vectores correspondientes en una proporción inserto:vector de 10:1 siguiendo las instrucciones del fabricante (LIGATE-IT, USB). Las células *E.coli* competentes HB101 (Promega) se transforman por choque térmico y se procede igual que en la clonación, pero utilizando placas de LB con Ampicilina pero sin X-Gal.

	Contiene		Detecta
	Enhancer SV40	Promotor SV40	
pGL3 Basic	No	No	Promotores
pGL3 Enhancer	Sí	No	Promotores
pGL3 Promotor	No	Sí	Enhancers Represores

**Tabla 1:** Tabla de los vectores pGL3 Basic, pGL3 Enhancer y pGL3 Promotor (Promega). Secuencias que contiene cada vector y actividad que se puede detectar.

### 2.5. Clonación del intrón 3 de *ADAMTSL3* y del intrón 1 de *HMGA2* en la orientación inversa

Para clonar estos fragmento en la orientación inversa, es decir, en orientación 3'-5', se procede de la misma forma que en el apartado 6.2 con la diferencia de que, en este caso, los oligonucleótidos tienen las dianas para las enzimas de restricción intercambiadas, de manera que los oligonucleótidos utilizados para en intrón 3 de *ADAMTSL3* son: 5'-ATACGGCTCGAGGCTTCCTTTGTCAGTTCAAAC-3' y 5'-GATCGGGAGCTCCCTTATACGCCACTCCAGATG-3', para la clonación del intrón 1 de *HMGA2* los oligonucleótidos utilizados son: 5'-ATACCGCTCGAGCCTCGACTTTCGCTATTGTG-3' y 5'-GATCGGGAGCTCAGGAATGGAGTGTCTGGGAAT-3'.



## **2.6. Clonación de los fragmentos del clon inicial del intrón 3 de *ADAMTSL3* y del intrón 1 de *HMGA2***

El fragmento de 1542 pb del intrón 3 de *ADAMTSL3* y de 1564 pb del intrón 1 de *HMGA2* se han dividido en fragmentos en los que se han ido delecionando porciones cada vez más grandes tanto desde el extremo 5' como del 3'. Estos clones se generan como se indica en el apartado 6.2, con las parejas de oligonucleótidos que se describen en las tablas anexas I y II. A continuación se procede a la subclonación de los fragmentos de *ADAMTSL3* en el vector *pGL3 Promotor*, y de los fragmentos de *HMGA2* en el vector *pGL3 Basic*, tal como se indica en el apartado 6.2.1.

Los fragmentos más representativos tanto de *ADAMTSL3* como de *HMGA2*, también han sido subclonados en la orientación opuesta mediante los oligonucleótidos indicados en las tablas anexas I y II, respectivamente.

## **3. ENSAYO DE LUCIFERASA**

Esta técnica nos permite cuantificar la actividad transcripcional de las regiones reguladoras de *ADAMTSL3* y *HMGA2* mediante la expresión de luciferasa, un gen reportero bioluminiscente.

Se han utilizado 3 líneas celulares: U2OS como modelo de osteocito, C3H/10T1/2 como modelo de célula mesenquimal y HEK293 como línea celular no relacionada con los condrocitos.

Para las transfecciones, el primer día se siembran 65.000 células U2OS, 40.000 células C3H/10T1/2 o 85.000 células HEK por pocillo en una placa de 24 pocillos. A las 24 horas las células se transfectan con los plásmidos de interés y siempre junto con el vector pRL-TK (Promega) que expresa de manera constitutiva la luciferasa *renilla*, y sirve para normalizar los datos en cuanto a la cantidad de transfección total, ya que emite luz a una longitud de onda diferente a la que lo hace la luciferasa *firefly*, contenida en los vectores *pGL3*. La transfección se lleva a cabo mediante el reactivo de transfección lipídico "FuGENE 6" (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los ratios que se han mantenido durante los experimentos son: FuGene:DNA de 2:1, pGL3:pHA de 2:1 y pGL3:pRL de 5:1, con un total de 1000ng para todos los experimentos, excepto para el experimento del SOX trío, donde la cantidad de ADN total es de 1600ng.

Tras 24 horas post-transfección, las células se lisan y se procede a la lectura de la luminiscencia de las dos luciferasas (*firefly* y *renilla*) mediante el lector Infinite M200 NanoQuant (TECAN) con el kit "Dual-Luciferase Reporter Assay System" (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante.

## 4. INMUNOPRECIPITACIÓN

Esta técnica permite comprobar la interacción entre dos proteínas. Se utilizó para comprobar si ADAMTSL3 y ADAMTS10 interaccionan entre sí y para estudiar qué dominio de ADAMTSL3 es el responsable de esta interacción.

La inmunoprecipitación comienza con la obtención del medio de cultivo enriquecido con la proteína de interés. La proteína ADAMTSL3 o sus fragmentos (Figura 11) está unida al péptido señal Myc, mientras que ADAMTS10 se expresa junto al péptido señal FLAG. La inmunoprecipitación comienza con cinco lavados de la resina ANTI-C-Myc (Sigma Aldrich) con PBS (*Phosphate Buffered Saline*), los lavados se realizan añadiendo a la resina 1ml de PBS, la mezcla se incuba con rotación durante 5 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se centrifuga durante 5 minutos a 800g y se elimina el sobrenadante. Tras los lavados, la resina se incuba con el medio de cultivo enriquecido en la proteína ADAMTSL3 durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se elimina el sobrenadante que contiene la proteína ADAMTSL3 que no se ha unido a la resina y esta misma resina se incuba con el lisado celular enriquecido en ADAMTS10 durante 2 horas a temperatura ambiente. Tras la incubación, el sobrenadante se elimina y se realizan cuatro lavados a la resina con PBS. Tras el último lavado, la resina se resuspende en 40 µl de buffer de carga para electroforesis de proteínas 2x (Tris HCl 0,12 pH 6,8, SDS 1,6%, glicerol 20%, azul de bromofenol 0,02% - SIGMA) y se hierve a 100°C durante 5 minutos. Las proteínas se separan mediante un Western Blot y se utilizan los anticuerpos necesarios para detectar la proteína de interés, contra FLAG (Sigma, dilución 1:3000) o contra Myc (Invitrogen, dilución 1:3000).

## 5. PCR CUANTITATIVA

Mediante esta técnica se detectan los niveles endógenos de ARN de un mensajero concreto, en nuestro caso de los genes *SHOX*, *ADAMTSL3*, *HMGA2* o *RPSAP52*. En el primer paso las células U2OS o HEK293 se transfectan con *pHA-SHOX* o *pHA* vacío; tras 24 horas las células se lisan y se extrae el lisado total con el kit "Universal Magnetic Co-IP kit" (Active Motif) siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación se extrae el ARN de estos lisados totales con el kit "RNeasy mini kit" (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se mide la concentración del ARN extraído con el lector Infinite M200 NanoQuant (TECAN), se prepara un máximo de 5000ng de ARN en un volumen final de 50µl con agua libre de RNAsas y se procede a la reacción de retrotranscripción con el kit "High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit" (Life Technologies) según sus indicaciones. Posteriormente, se procede a la PCR cuantitativa a tiempo real usando

90ng de ADNc, 1X de Taqman Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) y 1µl de la sonda Taqman correspondiente (Life Technologies) (Tabla 2), todo ello hasta un volumen final de 20µl.

Gen	Ensayo Taqman	Fluoróforo	Quencher
SHOX Exon 2-3	Hs00985362_m1	FAM	MGB
HMGA2 Exon 1-2	Hs00171569_m1	FAM	MGB
HMGA2 Exon 3-4	Hs00971724_m1	FAM	MGB
RPSAP52 Exon 1-2	Hs03677485_m1	FAM	MGB
ADAMTSL3 Exon 17-18	Hs00393492_m1	FAM	MGB
GAPDH		VIC	MGB

**Tabla 2: Sondas Taqman utilizadas en la presente Tesis Doctoral.** En la tabla se representa el gen, el fluoróforo y el quencher al que está unido cada sonda.

La reacción de PCR se lleva a cabo en un sistema 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) utilizando las condiciones recomendadas por el fabricante. Los datos se analizan mediante una hoja de cálculo de Excel utilizando GAPDH como control endógeno.

## 6. PACIENTES Y CONTROLES

Con la intención de buscar posibles variantes en los genes *ADAMTSL3* y *HMGA2* como responsables de la DLW en pacientes sin defectos moleculares en *SHOX* o sus *enhancers*, se han estudiado dos cohortes de pacientes, la primera está formada por 116 pacientes diagnosticados con DLW, o sospecha de ello, por presentar las características clínicas propias: talla baja con un acortamiento mesomélico de los miembros y la deformidad de Madelung. La segunda cohorte está formada por 175 pacientes con TBI, que presentan una talla por debajo de -2 DE sin una causa identificable. Estos pacientes proceden de diferentes hospitales tanto nacionales como internacionales. El estudio ha sido aprobado por el comité ético local y todos los pacientes o sus representantes legales dieron su aprobación mediante el consentimiento informado correspondiente. En todos los pacientes se ha excluido previamente la presencia de deleciones o mutaciones en *SHOX* o sus elementos *enhancers* mediante MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) y HRM (*High Resolution Melting*) o dHPLC (*Denaturing High-Performance Liquid Chromatography*) y/o secuenciación.

Los controles normales de diferentes orígenes étnicos han sido obtenidos a partir de distintas fuentes: (i) los 350 controles españoles de estatura normal (-2 a +2 DE), se han obtenido del Banco Nacional de ADN, Universidad de Salamanca, España; (ii) los 142 controles afro-caribeños sanos los ha proporcionado el Profesor Steve Humphries (University College London, Reino Unido)

y (iii) los 140 controles mejicanos sanos, el Dr. Patricio Barros (Instituto Mexicano del Seguro Social, Guadalajara, Jalisco, México). Además se ha utilizado la base de datos “Exome Variant Server” (NHLBI Exome Sequencing Project; <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>), en la que se pueden consultar unos 13.000 exomas secuenciados de pacientes afro-americanos y europeo-americanos con enfermedades cardíacas, hepáticas o sanguíneas.

## 7. EXTRACCIÓN DE ADN

Se extrajo la sangre periférica de los pacientes, y cuando fue posible, la de los familiares también. El ADN genómico se extrajo mediante el Kit “Blood Core Kit B” (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

## 8. BÚSQUEDA DE MUTACIONES, DELECCIONES Y DUPLICACIONES

La búsqueda de mutaciones en *ADAMTSL3* (NM\_207517.2) y *HMG2* (NM\_003483.4) se ha realizado mediante secuenciación directa o mediante HRM y posterior secuenciación, de sus 29 y 5 exones codificantes, respectivamente y las transiciones intrón-exón adyacentes.

### 8.1. Secuenciación directa

Cada fragmento de *ADAMTSL3* o *HMG2* se amplifica mediante PCR con los oligonucleótidos correspondientes, diseñados con la ayuda de Oligo 6.0 (Molecular Biology Insights) (Tablas anexas 4 y 5). Las condiciones de PCR utilizadas son: 1x PCR Buffer II (Applied Biosystems), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> (Applied Biosystems), 1U de AmpliTaq Gold (Applied Biosystems), 0.2 mM de dNTPs (Roche), 0.4 μM de cada oligonucleótido y 50 ng de ADN, todo ello en un volumen final de 25 μl. Las condiciones de amplificación son: 95°C de desnaturalización durante 10 min, 35 ciclos de: 95°C durante 30 segundos, a la temperatura de anillamiento correspondiente (Tablas anexas 4 y 5) 30 segundos y 72°C durante 45 segundos, y una extensión final de 8 minutos a 72°C.

Posteriormente los productos de PCR se purifican con EXO-SAP-IT (USB), se secuencian con el terminador BigDye V3.1 (Applied Biosystems) y las reacciones de secuenciación se purifican mediante CleanSEQ (Agencourt). Los productos se secuencian en el secuenciador ABI3730XL (Applied Biosystems) y se analizan con el software Sequencher V5.0 (Gene Codes).

### 8.2. HRM

HRM es una técnica post-PCR que permite la detección de polimorfismos y variantes génicas. Se basa en el análisis de las curvas de fusión de fragmentos genómicos amplificados mediante PCR

en presencia del agente intercalante fluorescente LCGreen Plus (Idaho Technology Inc, UTAH, USA) que se añade de manera saturante. Así, el producto de PCR es sometido a un gradiente creciente de temperatura y la intensidad de fluorescencia emitida va disminuyendo a medida que la doble hélice se va desnaturalizando.

Esta técnica se ha utilizado en la detección de variantes en la secuencia de los genes *ADAMTSL3* y *HMGA2* en parte de la cohorte de pacientes con DLW y en la cohorte completa de pacientes con TBI. Tras el análisis mediante HRM de las cohortes, se seleccionan las muestras cuyo perfil se diferencia de las muestras control y se analizan por secuenciación. Los oligonucleótidos y condiciones utilizadas para HRM son las mismas que las utilizadas para la amplificación por PCR (Tablas anexas III y IV), excepto para los amplicones del exón 1 de *HMGA2*, que no se pudo poner a punto para HRM, y los exones 18 y 22 de *ADAMTSL3*, que se diseñaron de nuevo (Tabla anexa III).

### **8.3. Análisis de las variantes identificadas en el gen *ADAMTSL3* y *HMGA2* en controles sanos**

La frecuencia alélica de las variantes encontradas en los genes *ADAMTSL3* y *HMGA2* se analizó en los respectivos controles sanos de su mismo origen étnico con el objetivo de comprobar si dichas variantes están presentes en población normal, y si así fuera, estimar la frecuencia en la que se encuentran en población normal y así evaluar su posible patogenicidad. Se realizó mediante HRM, digestión con enzimas de restricción y posterior separación de los fragmentos en un gel de agarosa o mediante secuenciación directa.

### **8.4. MLPA de diseño propio**

El ensayo de MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) es una técnica que permite detectar alteraciones en el número de copias de una región génica determinada. Se ha utilizado con el objetivo de buscar posibles alteraciones en el número de copias en los genes *ADAMTSL3* y *HMGA2* en los pacientes anteriormente descritos. Se han diseñado sondas de MLPA que hibridan a lo largo de ambos genes y en sus regiones flanqueantes. En concreto, el ensayo de MLPA para *ADAMTSL3* consta de 8 sondas exónicas, mientras que el ensayo de *HMGA2* consta de 5 sondas exónicas, además ambos ensayos contienen dos sondas flanqueantes al gen y, adicionalmente, tres sondas complementarias a secuencias situadas en cromosomas diferentes al 15 y al 12, donde se encuentran *ADAMTSL3* y *HMGA2*, respectivamente, que sirven como control de número normal de copias (Anexo V y VI).

El MLPA se ha realizado con los reactivos Salsa EK5 MLPA (MRC Holland), siguiendo las instrucciones de este fabricante. Los fragmentos se separan en un secuenciador ABI3130XL y los resultados se analizan mediante una hoja de cálculo de Excel en la que se comparan las áreas de los picos de las muestras control con la de cada uno de los pacientes para su normalización. Se considera que una muestra presenta dos copias cuando el valor normalizado de las sondas está comprendido entre 0,65 y 1,35; si el valor normalizado de las sondas está por debajo de 0,65 se consideran delecionadas, mientras que aquellas con valores mayores de 1,35 se consideran duplicadas.

### **8.5. Análisis del grado de patogenicidad de las variantes identificadas en *ADAMTSL3* y *HMGA2***

Las variantes encontradas en la secuencia de *ADAMTSL3* y *HMGA2* se han analizado en profundidad para poder valorar su posible grado de patogenicidad. Para cada variante hemos analizado:

- **Conservación del residuo a lo largo de la evolución:** nos indica cómo de crítico es este aminoácido para que la función de la proteína no se altere.

- **Posición en la proteína:** un aminoácido que esté formando parte de un dominio funcional de *ADAMTSL3* o *HMGA2* podría ser más crítico que uno situado fuera de los dominios.

- **Análisis de cosegregación:** es fundamental para determinar si una variante es responsable del fenotipo de la familia. Aunque no se ha podido llevar a cabo en todas las familias, y en otras no ha sido concluyente.

- **Frecuencia alélica de las variantes en población general y en población española de estatura normal:** la presencia de estas variantes en población general según la base de datos *Exome Variant Server* es de gran utilidad para determinar si las variantes encontradas son polimorfismos o podrían ser patogénicas, ya que aporta los exomas de al menos 6.500 individuos reclutados en estudios de cohortes de pacientes con problemas cardíacos, hepáticos o pulmonares. En esta línea, el análisis de las variantes en población del mismo origen étnico al de los pacientes también es esencial para verificar que los cambios no son polimorfismos propios de la población de origen étnico de cada paciente. Además, el análisis del grupo de población española de estatura normal nos indica qué variantes no están afectando a la estatura. Para ambos casos, una frecuencia alélica <1% indica que el cambio puede considerarse como mutación potencial, mientras que una frecuencia >1% indica un probable polimorfismo.

- **Predicción bioinformática de patogenicidad:** este dato nos puede ayudar a interpretar la posible patogenicidad de una variante, pero hay que tomarlo con cautela, ya que ninguna de las

herramientas bioinformáticas disponibles hasta la fecha son fiables al 100%. Si dos herramientas bioinformáticas de predicción de patogenicidad independientes (*Polyphen* y *MutationTaster*), coinciden en clasificar una variante como probablemente patogénica, se considera relevante, reforzándose el valor predictivo de las mismas.

### **8.6. Análisis del efecto de las variantes sobre el mecanismo de *splicing***

El análisis del efecto de las variantes encontradas en los genes de estudio sobre el proceso de *splicing*, se ha llevado a cabo mediante distintas herramientas informáticas reunidas en el programa Alamut v2.0 (Interactive Biosoftware). Estas herramientas informáticas de predicción de *splicing* son: *Human Splicing Finder*, *Splice Site Finder-Like*, *MaxEntScan*, *NNSPLICE* y *Gene Splicer*.

## **9. IMMUNOHISTOQUÍMICA**

Los ensayos de inmunohistoquímica nos permiten comprobar si SHOX, ADAMTSL3 y HMGA2 se expresan en los condrocitos de la placa de crecimiento humana y más específicamente en las mismas zonas de dicha placa.

Las muestras de tibia se han obtenido a partir de cuatro fetos sin deformidades esqueléticas de 18, 20, 28 y 32 semanas de gestación que sufrieron un aborto espontáneo. El estudio ha sido aprobado por el comité ético local. Las muestras se incluyen en parafina y se cortan en secciones de 3 µm en un micrótopo, posteriormente se fijan durante 2 horas a 60°C. El desparafinado y recuperación del epítipo se realiza en el PTLINK (Dako) durante 20 min a 95°C en Target Retrieval Solution, pH 9 (Dako). Para la detección de HMGA2 las muestras se someten a un proceso adicional de desenmascaramiento del antígeno que consiste en la incubación de las muestras en una solución de citrato sódico 0,01M pH6 durante 20 minutos en un baño a 80°C de temperatura. Tras este tratamiento las muestras se tratan de la misma forma que las demás. La peroxidasa endógena se bloquea con 0.3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en metanol durante 30 minutos. El bloqueo se llevó a cabo con 10% de suero de caballo (Vectastain ABC kit universal, Vector Laboratories) en PBS durante 20 minutos. Las secciones se incuban durante la noche a 4°C con el anticuerpo contra SHOX hecho en conejo (1/50) (anticuerpo realizado en el laboratorio contra el péptido N-terminal KVHVDNDKEKLKEF conjugado a KLH), con el anticuerpo contra ADAMTSL3 obtenido en conejo (1/100) (CDESPASRELDIPLPEDSE, Hall et al, 2003; donado por el Dr. Suneel Apte) ó con el anticuerpo contra HMGA2 obtenido en cabra (1/50) (R&D Systems, AF3184, Ser2-Asp109). Tras varios lavados, las muestras se incuban con el anticuerpo secundario contra conejo obtenido en

cabra (1/1000) (IgG biotinilado, Cultek Pierce 31822) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se utiliza el sistema de avidina/biotina-HRP (ABC Universal kit, Vector Labs) para detectar los anticuerpos y DAB (Vector Labs) para revelar. Las secciones se contratiñen con hematoxilina. (Sigma). Posteriormente se deshidratan mediante concentraciones crecientes de etanol y finalmente en xileno y se montan con Depex (BDH). El control negativo se realiza reemplazando el anticuerpo primario por PBS. Finalmente, las secciones se examinan con el microscopio CTR5500 de Leica y fotografian con la cámara DFC425 de Leica mediante el software Leica Application Suite (Leica).



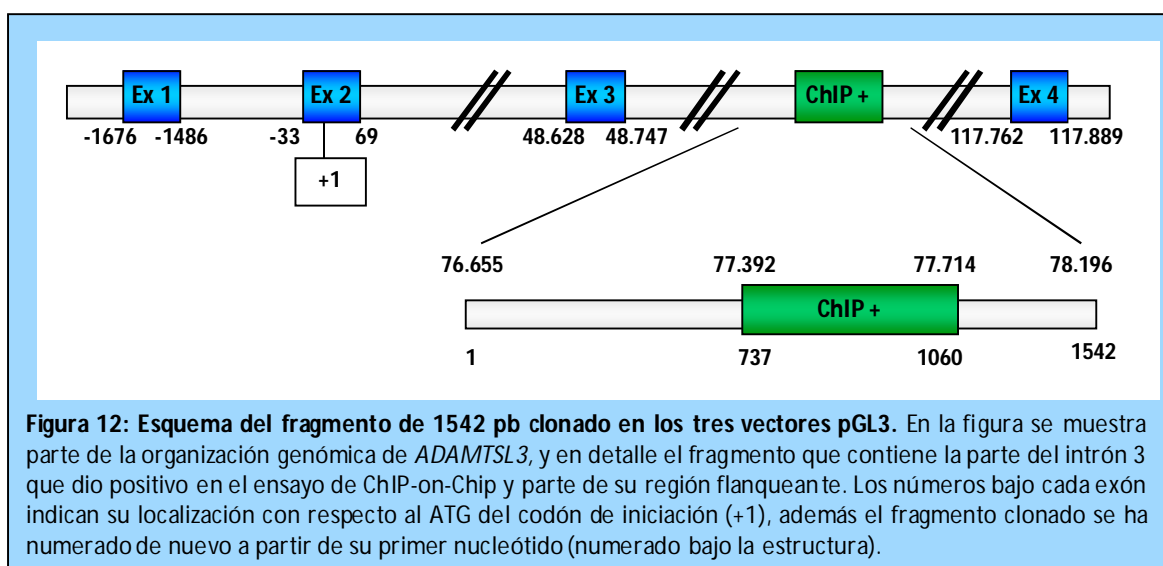
## RESULTADOS



## 1. ADAMTSL3

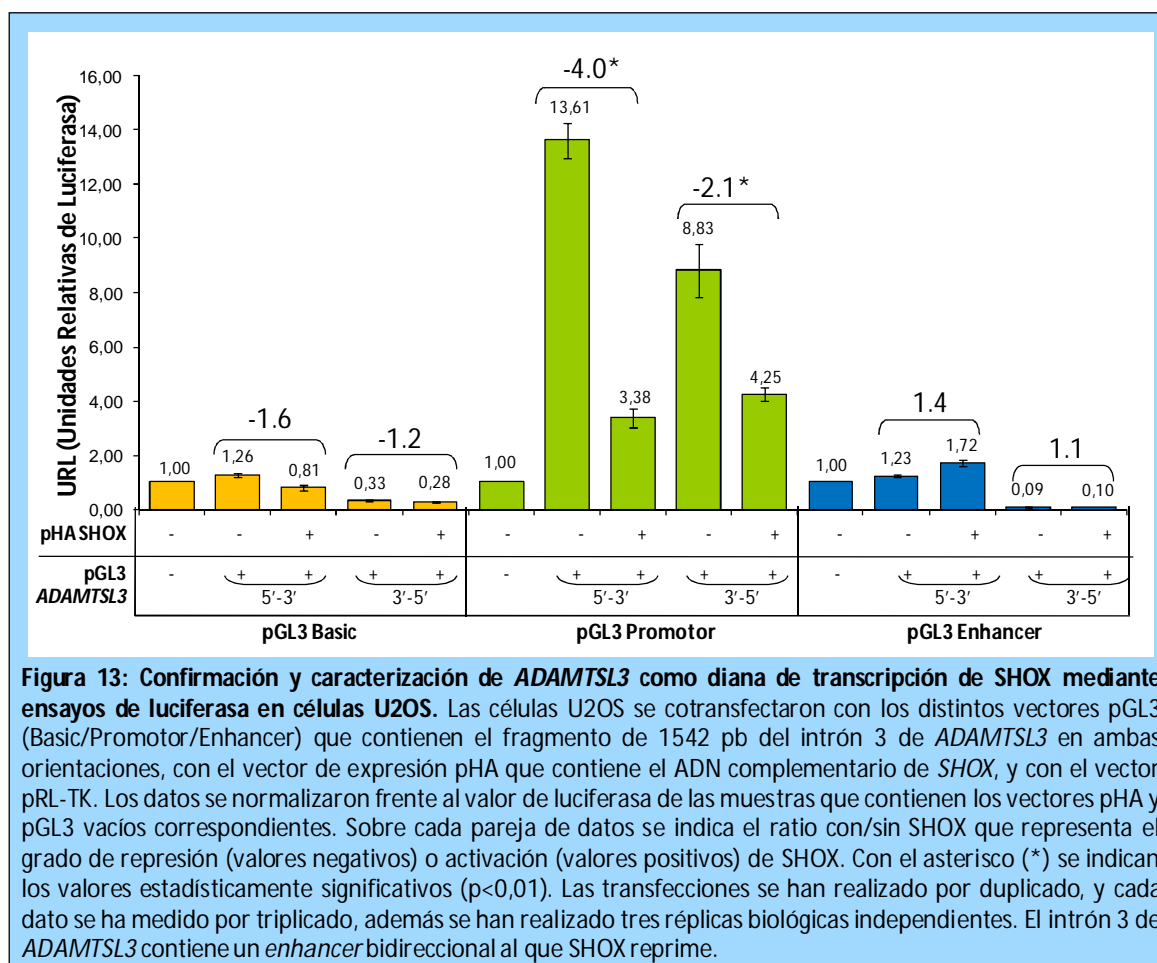
### 1.1. Confirmación de *ADAMTSL3* como diana de transcripción de SHOX

La confirmación y caracterización de *ADAMTSL3* como diana de transcripción de SHOX se llevó a cabo mediante ensayos de luciferasa en células de osteosarcoma humano (U2OS). Se comparó el efecto de SHOX sobre el fragmento completo del intrón 3 de *ADAMTSL3* que dio positivo en el ensayo de ChIP on Chip y parte de su secuencia flanqueante (1542 pb) (Figura 12), en ambas orientaciones. Dicho fragmento se clonó en los tres vectores pGL3: Basic, Enhancer y Promotor. Mientras que el vector pGL3 Basic no contiene en su secuencia ningún promotor o *enhancer*, el vector pGL3 Enhancer y pGL3 Promotor contienen un *enhancer* o un promotor de SV40, respectivamente, detrás y delante del gen reportero de la luciferasa. Los experimentos en paralelo con los tres vectores, permiten determinar qué tipo de elemento regulador contiene el fragmento de *ADAMTSL3* a analizar, un promotor, si utilizamos los vectores pGL3 Basic o pGL3 Enhancer, o un *enhancer*, si utilizamos el vector pGL3 Promotor. Además, la clonación del fragmento en ambas orientaciones en los tres vectores, nos permite determinar si los elementos reguladores contenidos en dicho fragmento funcionan de manera unidireccional o bidireccional.



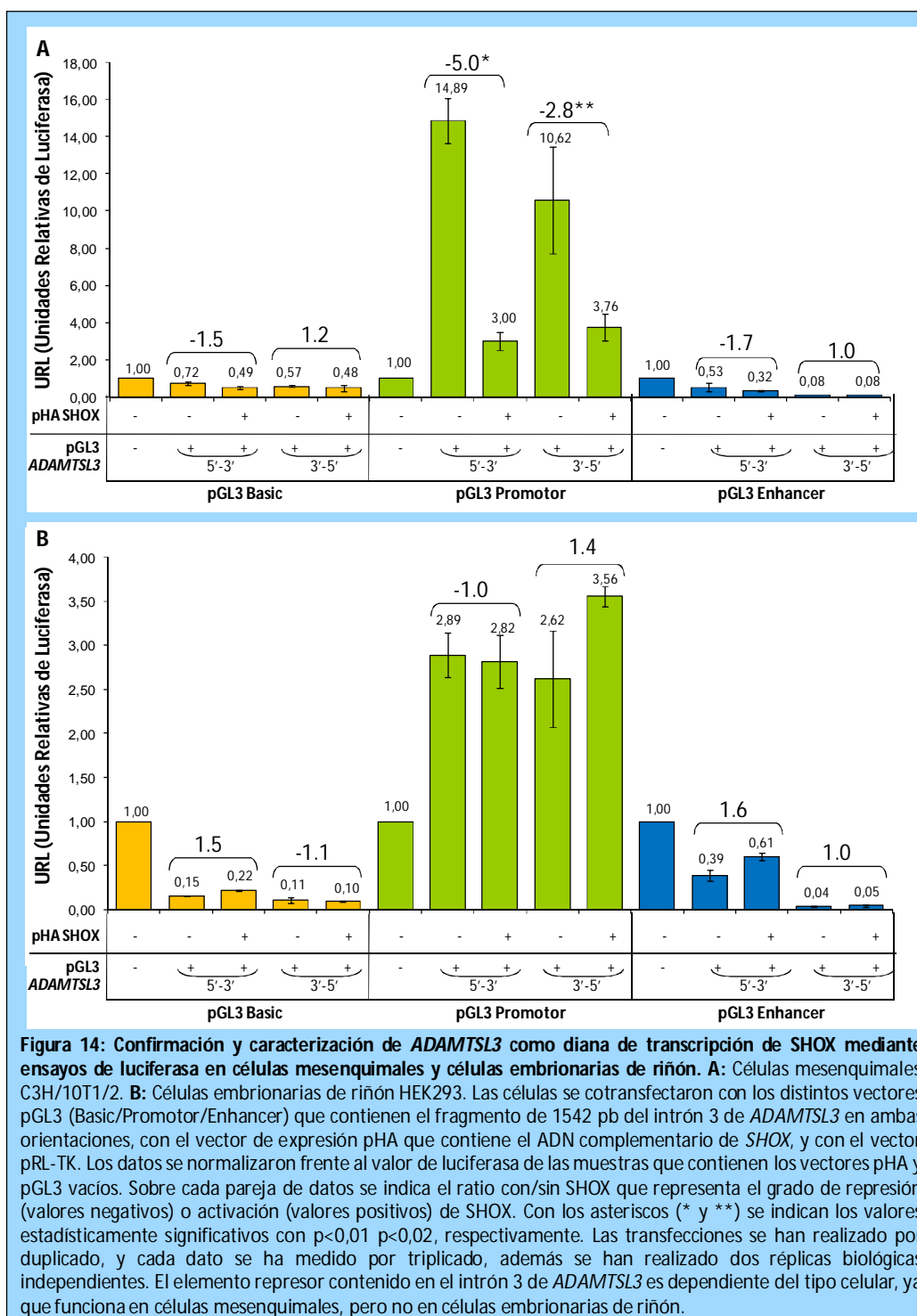
Los resultados se han estructurado en tres bloques, en función del vector pGL3 utilizado (Figura 13). Dentro de cada bloque se ha comparado la expresión de luciferasa con el fragmento de *ADAMTSL3* en ambas orientaciones, en ausencia y presencia de SHOX. Con respecto a pGL3 Basic, los resultados muestran que no hay ningún promotor. Con respecto a pGL3 Promotor, los resultados indican que existe un *enhancer* en esta región, ya que la actividad de luciferasa se ve incrementada con dicho fragmento. Este *enhancer* también es funcional cuando el fragmento se

encuentra clonado en orientación opuesta. Con respecto a pGL3 Enhancer, la actividad que se registra se considera insignificante comparándola con la de pGL3 Promotor, por lo que consideramos que no hay ningún elemento promotor en la región de estudio. Los datos obtenidos utilizando pGL3 Basic y pGL3 Enhancer se correlacionan entre ellos y muestran que el fragmento analizado no contiene ninguna secuencia promotora, mientras que los datos obtenidos con pGL3 Promotor confirman que el amplio fragmento de *ADAMTSL3* de 1542 pb contiene un elemento regulador. Sobre este nuevo *enhancer*, SHOX ejerce un efecto de represión de unas 4 veces, y también de unas 2.1 veces cuando dicho *enhancer* se encuentra en orientación opuesta.



### 1.1.1. Comparación de la actividad represora de SHOX sobre *ADAMTSL3* en otros tipos celulares

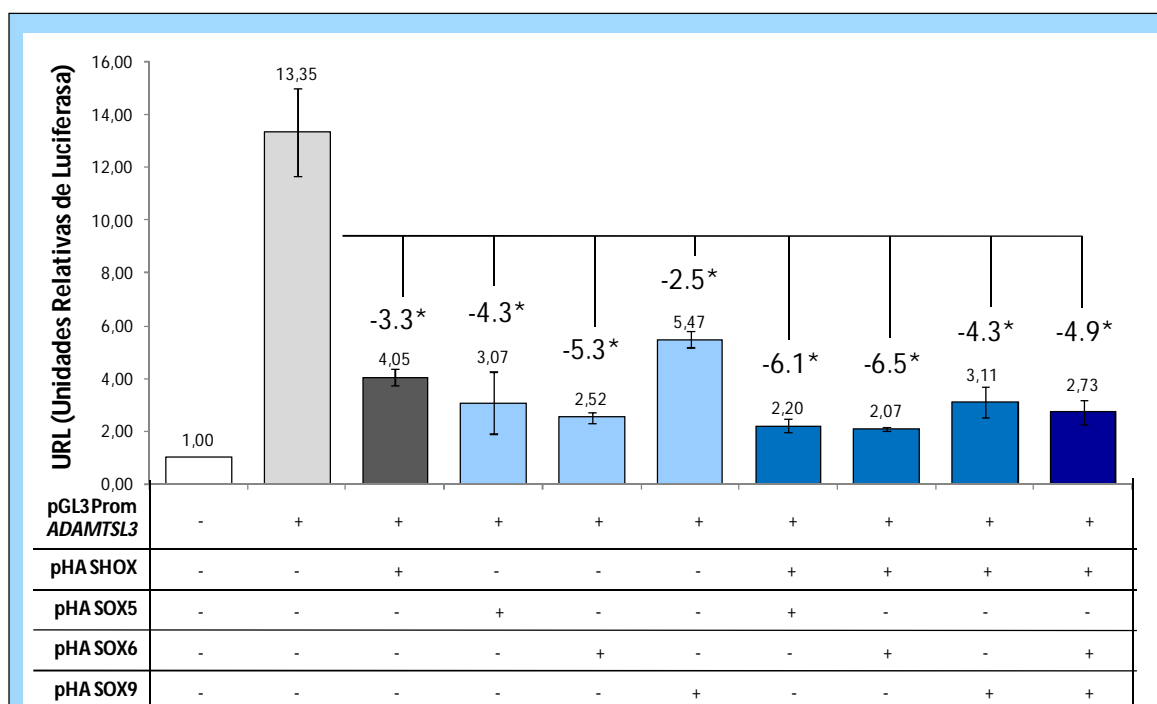
Para comprobar si el efecto de SHOX sobre el fragmento del intrón 3 de *ADAMTSL3* es dependiente del tipo celular, estos ensayos de luciferasa se repitieron en células C3H/10T1/2 (Figura 14A) y HEK293 (Figura 14B), como modelo de células mesenquimales y células de otro linaje, respectivamente.



Los resultados de los ensayos de luciferasa en las células C3H/10T1/2 (Figura 14A) muestran que, al igual que en células U2OS, existe un elemento *enhancer* bidireccional en el intrón 3 de *ADAMTSL3* al que *SHOX* reprime. En células HEK293 (Figura 14B) el elemento *enhancer* identificado en *ADAMTSL3* también es funcional, pero *SHOX* no ejerce ningún efecto sobre él. Por tanto, este elemento *enhancer* al que *SHOX* reprime, es dependiente del tipo celular.

### 1.1.2. Efecto del trío de SOX en la regulación de SHOX sobre *ADAMTSL3*

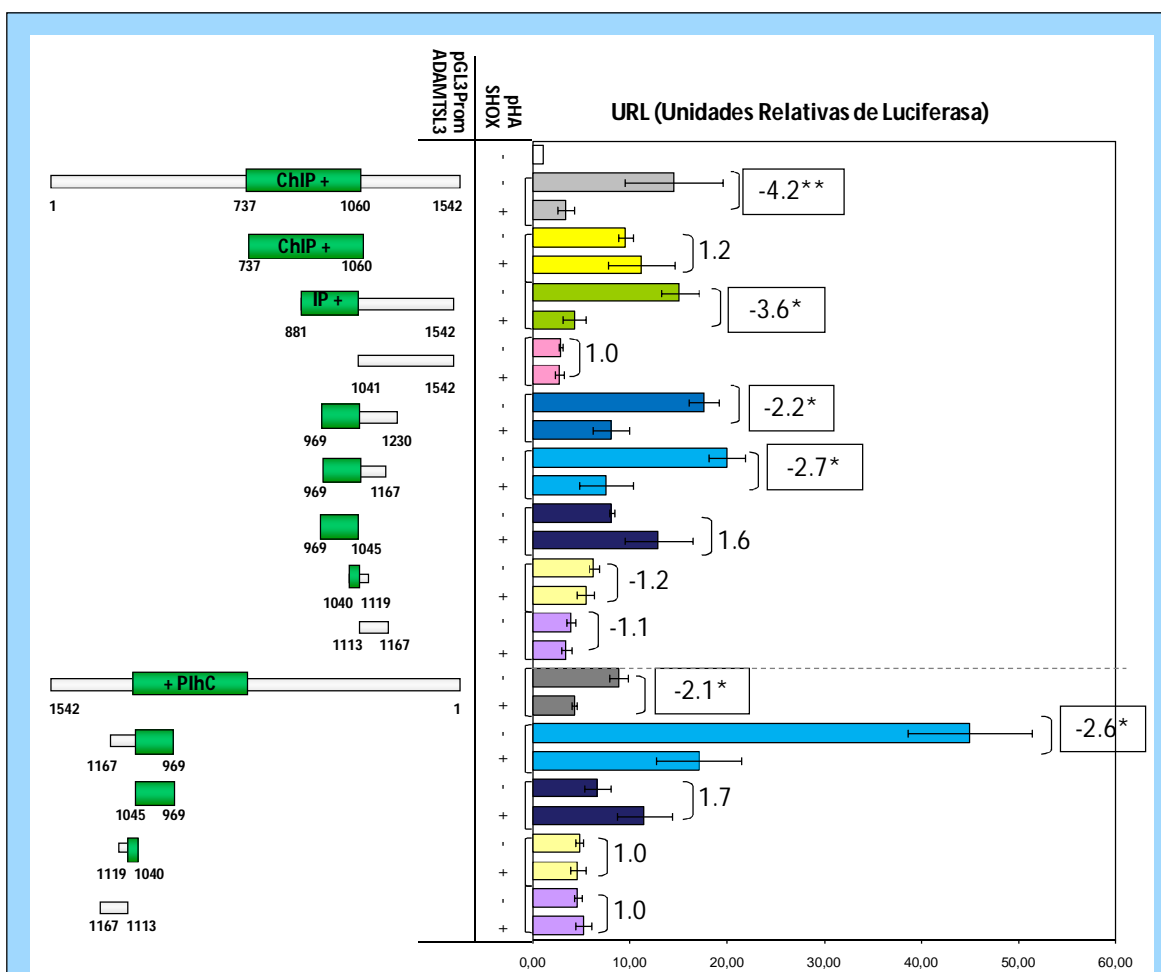
Recientemente nuestro grupo ha descrito que SHOX coopera con el grupo de cofactores SOX5, SOX6 y SOX9, también conocido como el trío de SOX, para activar el *enhancer* del *agrecano* (Aza-Carmona et al, 2011). Para comprobar si el trío de SOX influye en la regulación de SHOX sobre *ADAMTSL3*, llevamos a cabo ensayos de luciferasa en células U2OS con diferentes combinaciones de estos cofactores (Figura 15). Dado que SOX5 y SOX6 tienen una función redundante (Smits et al, 2001), se han utilizado de manera indistinta en estos experimentos. Los resultados muestran que los cofactores SOX5, SOX6 y SOX9, al igual que SHOX, ejercen un efecto de represión sobre el *enhancer* de *ADAMTSL3*. Cuando cada uno de los cofactores se expresa junto a SHOX, el efecto de represión parece aditivo, pero cuando lo hace el trío completo el efecto no se intensifica.



**Figura 15: Análisis del efecto del trío de SOX en la regulación de SHOX sobre el *enhancer* presente en *ADAMTSL3* mediante ensayos de luciferasa en células U2OS.** Las células U2OS se cotransfectaron con el vector pGL3 Promotor que contiene el fragmento de 1542 pb del intrón 3 de *ADAMTSL3*, con el vector de expresión pHA que contiene el ADN complementario de *SHOX*, *SOX5*, *SOX6* o *SOX9*, y con el vector pRL-TK. Los datos se normalizaron frente al valor de luciferasa de la muestra que contiene el vector pHA y pGL3 Promotor vacíos. Sobre cada valor se indica el ratio con respecto al valor de luciferasa de pGL3 Promotor-ADAMTSL3, de manera que los valores negativos indican el grado de represión de SHOX. Con el asterisco (\*) se indican los valores estadísticamente significativos ( $p < 0,01$ ). Las transfecciones se han realizado por duplicado, y cada dato se ha medido por triplicado, además se han realizado tres réplicas biológicas independientes. Los cofactores que forman el trío de SOX reprimen el *enhancer* presente en *ADAMTSL3* al igual que SHOX, además, el efecto parece aditivo cuando SHOX actúa en conjunto con los cofactores.

### 1.1.3. Delimitación del elemento regulador presente en el intrón 3 de *ADAMTSL3*

Para poder acotar la región reguladora presente en el intrón 3 de *ADAMTSL3* se realizaron ensayos de luciferasa con fragmentos cada vez más pequeños de dicha región clonados en el vector pGL3 Promotor, y se compararon los resultados en presencia y ausencia de SHOX (Figura 16). Los fragmentos que se consideraron más informativos también se clonaron en orientación 3'-5'.



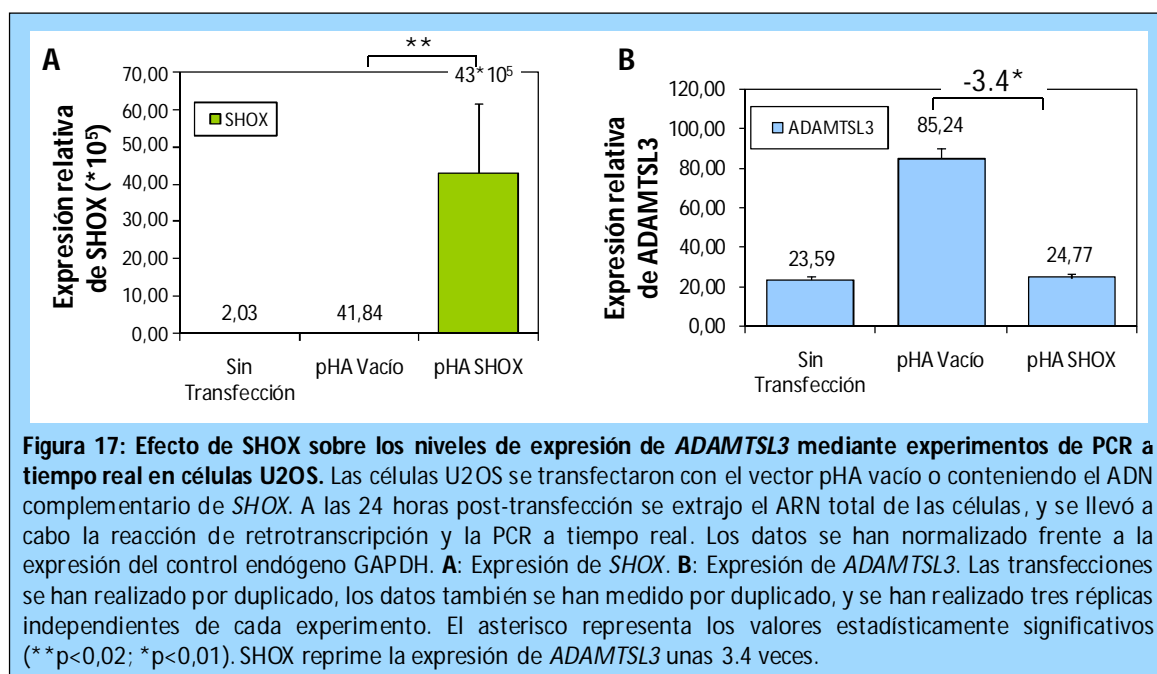
**Figura 16: Delimitación del elemento regulador presente en el intrón 3 de *ADAMTSL3* mediante ensayos de luciferasa en células U2OS.** Las células U2OS se cotransfectaron con el vector pGL3 Promotor que contiene los distintos fragmentos del intrón 3 de *ADAMTSL3*, con el vector de expresión pHA que contiene el ADN complementario de *SHOX*, y con el vector pRL-TK. Junto al gráfico se representan de forma esquemática las distintas construcciones de *ADAMTSL3* que se han utilizado, y bajo cada una de ellas se indican los nucleótidos contenidos. Los datos se normalizaron frente al valor de luciferasa de las muestras que contienen los vectores pHA y pGL3 Promotor vacíos. Sobre cada pareja de datos se indica el ratio con/sin *SHOX* que representa el grado de represión, valores negativos, o activación, valores positivos, de *SHOX*. Con los asteriscos y recuadrados se indican los valores estadísticamente significativos (\*\*p<0,05; \*p<0,01). Las transfecciones se han realizado por duplicado, y cada dato se ha medido por triplicado, además se han realizado tres réplicas biológicas independientes. La línea de puntos separa los fragmentos clonados en orientación 3'-5'. ChIP+: región del intrón 3 de *ADAMTSL3* que dio positivo en el ensayo de ChIP on Chip. El *enhancer* bidireccional presente en el intrón 3 de *ADAMTSL3* se ha delimitado al fragmento de 198 pb que abarca los nucleótidos 969-1167.

Los resultados muestran que los fragmentos sobre los que SHOX mantiene su acción represora intacta son los que abarcan los nucleótidos 881-1542, 969-1230 y 969-1167, mientras que la presencia de SHOX no ejerce capacidad represora sobre los fragmentos 737-1060, 1041-1542, 969-1045, 1040-1119 y 1113-1167. Es decir, que la región de 198 pb que abarca los nucleótidos 969-1167, es la región mínima en la que el *enhancer* conserva su funcionalidad (Figura 16). En cuanto a los fragmentos clonados en orientación 3'-5', se observa lo mismo, es decir, que la región que abarca los nucleótidos 969-1167 en orientación 3'-5' es la única funcional.

En resumen, el conjunto de estos datos indican que en el pequeño fragmento de 198 pb que abarca los nucleótidos 969-1167 del intrón 3 de *ADAMTSL3*, existe un elemento regulador *enhancer* dependiente de SHOX que actúa de forma bidireccional.

## 1.2. Efecto de SHOX sobre la expresión endógena de *ADAMTSL3*

Para confirmar que el efecto de represión que se ve en los ensayos de luciferasa, sucede también al nivel de expresión endógena de *ADAMTSL3*, se realizaron ensayos de PCR a tiempo real en células U2OS, en los que se compararon los niveles de ARN endógeno de *ADAMTSL3* en presencia o ausencia de SHOX (Figura 17). Los resultados demuestran que la sobreexpresión de SHOX reprime la expresión de ARN endógeno de *ADAMTSL3* unas 3.4 veces (Figura 17).

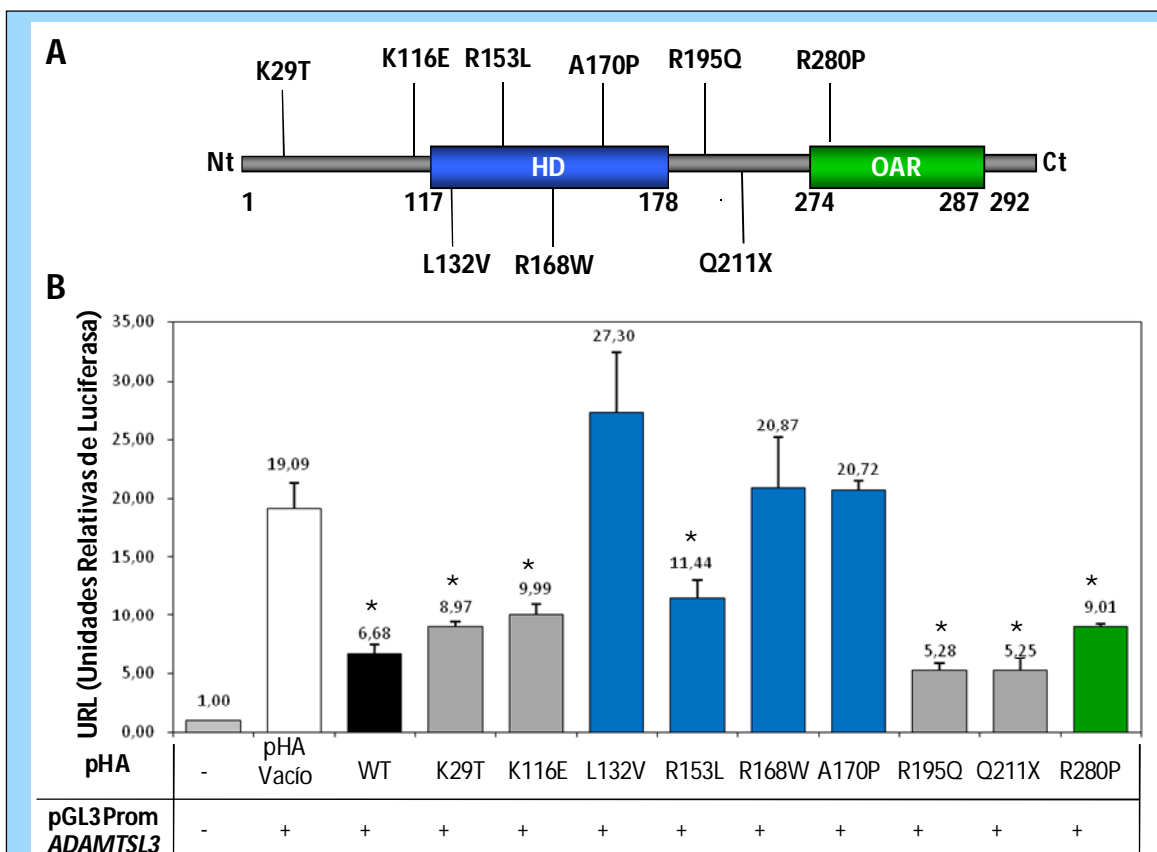




### 1.3. Análisis del efecto de las mutaciones de SHOX sobre la regulación de *ADAMTSL3*

Con el objetivo de verificar la especificidad del efecto de represión de SHOX sobre el *enhancer* del intrón 3 de *ADAMTSL3*, se llevaron a cabo experimentos de luciferasa en células U2OS en los que se comparó el efecto de la sobreexpresión de SHOX salvaje con respecto al de SHOX conteniendo algunas mutaciones encontradas en pacientes con DLW (Figura 18A).

Los resultados indican que las mutaciones localizadas en el homeodominio (p.L132V, p.R168W y p.A170P), provocan que SHOX pierda su capacidad de represión sobre *ADAMTSL3* (Figura 18B). Sin embargo, la mutación p.R153L, a pesar de estar localizada igualmente en el homeodominio, mantiene la capacidad de represión de SHOX. Por otro lado, las mutaciones



**Figura 18: Análisis de la capacidad de represión de SHOX sobre el intrón 3 de *ADAMTSL3* mediante ensayos de luciferasa en células U2OS.** **A:** Esquema de la proteína SHOX indicando las mutaciones puntuales introducidas, así como los aminoácidos que contiene cada dominio. HD = Homeodominio; OAR = Dominio de transactivación. **B:** Representación de los valores relativos de luciferasa. Las células U2OS se transfectan con el vector pGL3 Promotor que contiene el fragmento de 1542 pb del intrón 3 de *ADAMTSL3*, con el vector pHA conteniendo el ADN complementario de *SHOX* salvaje o de sus mutantes y el vector pRL-TK. Los datos se normalizaron frente al valor de luciferasa de los vectores pGL3 y pHA vacíos. El asterisco indica los datos que son estadísticamente significativos con  $p < 0,01$  con respecto al valor de pGL3 Promotor conteniendo el intrón 3 de *ADAMTSL3* en ausencia de SHOX. Las transfecciones se han realizado por duplicado, y cada dato se ha medido por triplicado, además se han realizado tres réplicas biológicas independientes. Las mutaciones presentes en el homeodominio de SHOX, a excepción de p.R153L, anulan su capacidad represora sobre *ADAMTSL3*.

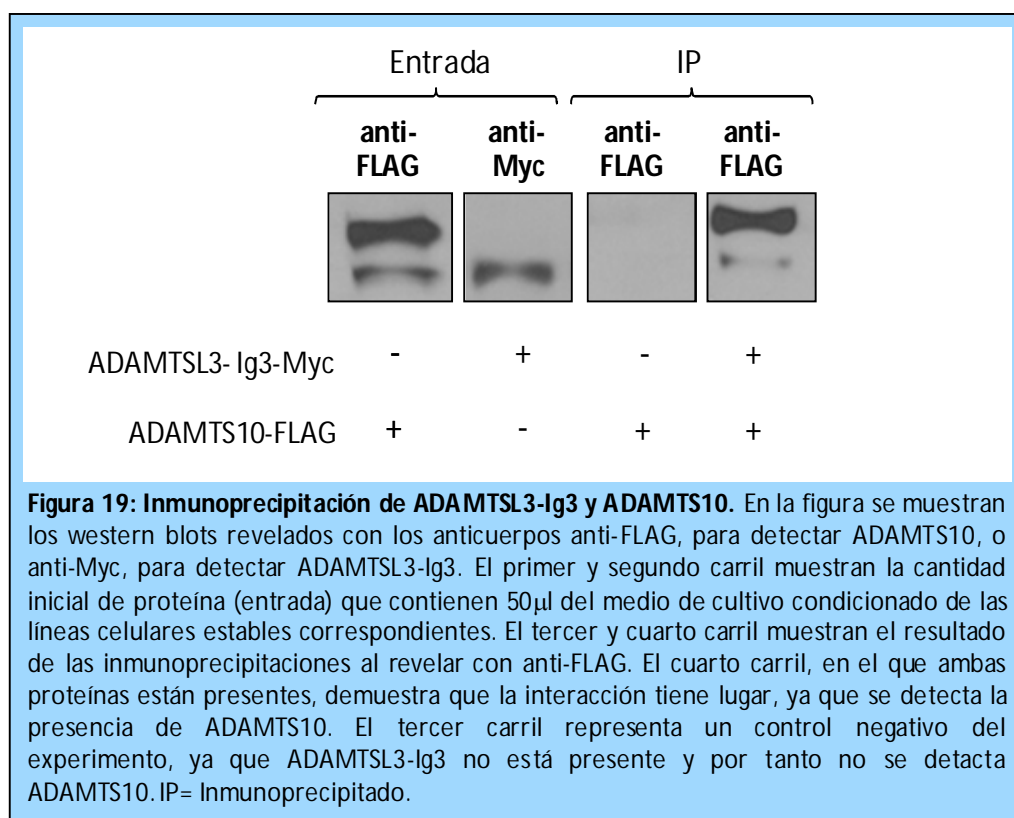
localizadas en el dominio de transactivación o fuera de los dominios funcionales no parecen afectar a la capacidad represora de SHOX (Figura 18B).

## 1.4. Ensayos funcionales con ADAMTSL3

### 1.4.1. Confirmación de la interacción entre ADAMTSL3 y ADAMTS10

A pesar de que a día de hoy se desconoce en profundidad la función de ADAMTSL3, en 2010 se presentó en un congreso que ADAMTSL3 y ADAMTS10, un miembro de su misma familia, interaccionan entre ellas. Con el objetivo de desarrollar un posible ensayo funcional para investigar la posible implicación de esta interacción en las patologías causadas por defectos en SHOX, llevamos a cabo experimentos de inmunoprecipitación (IP) para confirmar la interacción entre dichas proteínas. En ese momento aún no se habían publicado los datos de esta interacción. Estos ensayos se llevaron a cabo en el laboratorio del Dr. Suneel Apte (Cleveland Clinic, Ohio, EEUU) durante una estancia corta de tres meses que realicé en su laboratorio en 2011. Posteriormente, en 2012, Sengle y colaboradores publicaron sus resultados (Sengle et al, 2012).

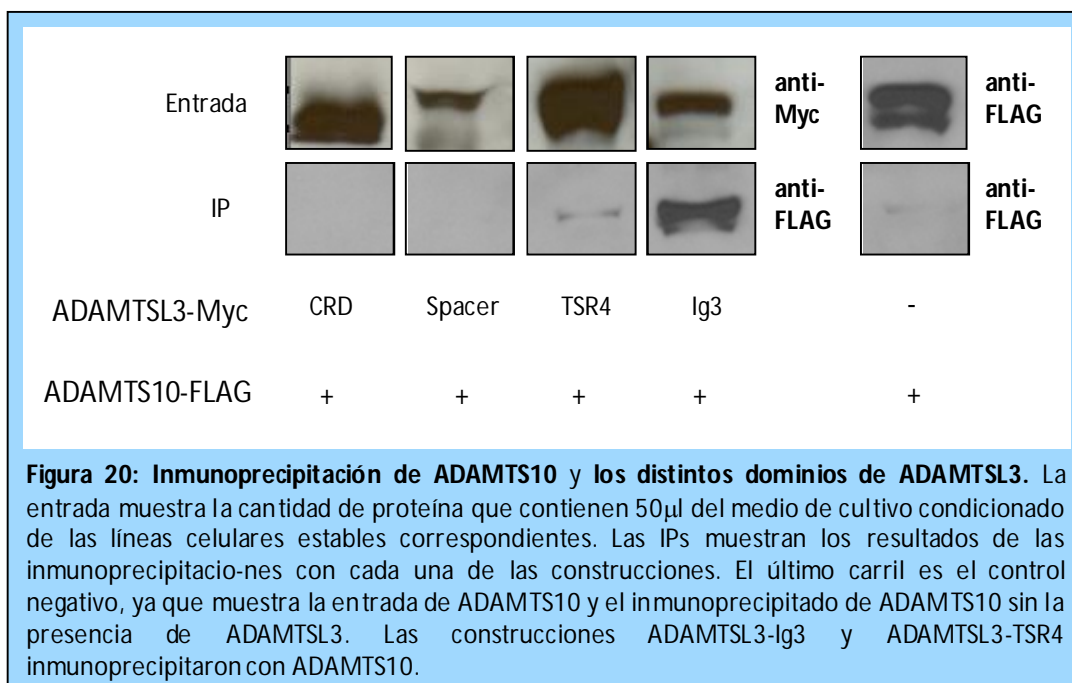
Para los ensayos de IP las proteínas ADAMTSL3 y ADAMTS10 se obtuvieron del medio de cultivo de líneas estables de células HEK293, que expresan cada una de estas proteínas de manera constitutiva. En el caso de ADAMTSL3, se utilizó la construcción ADAMTSL3-Ig3, que contiene hasta el tercer dominio de tipo inmunoglobulina, por ser la construcción más larga que es



expresada en cantidades suficientes por las células estables (Figura 11). Los resultados confirmaron que las proteínas ADAMTSL3-Ig3 y ADAMTS10 interactúan entre sí (Figura 19).

#### 1.4.2. Identificación del dominio de ADAMTSL3 responsable de la unión a ADAMTS10

Posteriormente se estudió qué dominio de ADAMTSL3 interactúa con ADAMTS10. Se realizó mediante ensayos de inmunoprecipitación en células HEK293 con ADAMTS10 salvaje y las diferentes construcciones de ADAMTSL3 (Figura 11). Los resultados indican que la construcción ADAMTSL3-TSR4 es el fragmento más pequeño de ADAMTSL3 que conserva su capacidad de interacción con ADAMTS10, ya que ADAMTS10 no inmunoprecipitó con las construcciones ADAMTSL3-Spacer y ADAMTSL3-CRD (Figura 20).



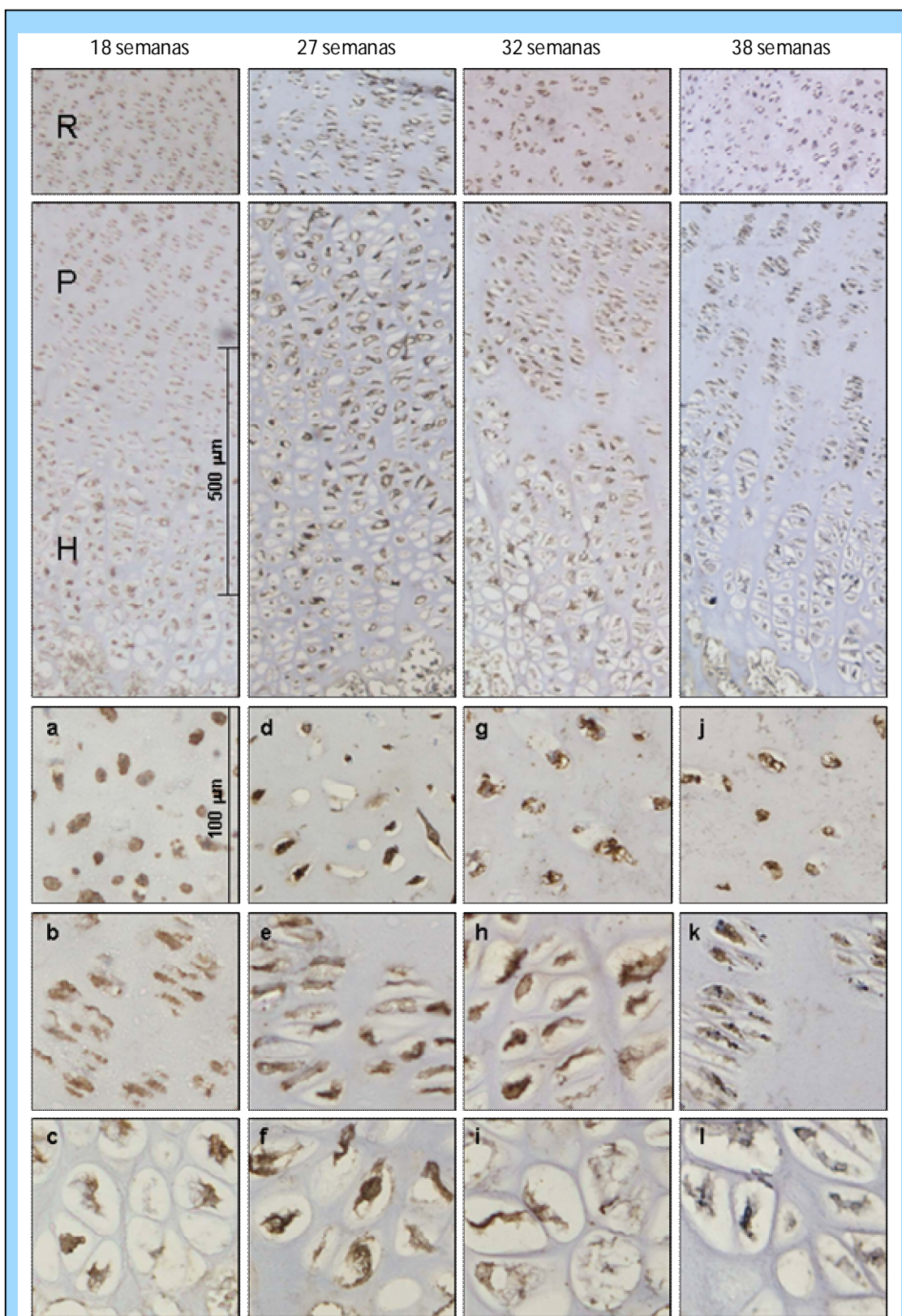
#### 1.5. Coexpresión de ADAMTSL3 y SHOX en la placa de crecimiento humana

Para demostrar que SHOX y ADAMTSL3 colocalizan en la placa de crecimiento humana, y así, poder implicar a ADAMTSL3 en la regulación del crecimiento óseo, se llevó a cabo un ensayo de inmunohistoquímica de la expresión de SHOX (Figura 21) y de ADAMTSL3 (Figura 22) en la placa de crecimiento de tibia de cuatro fetos normales, de 18, 27, 32 y 38 semanas de gestación.

En estos experimentos se observa que la expresión de SHOX se da en todas las regiones de la placa de crecimiento a lo largo del desarrollo (Figura 21). En la región de reserva, la expresión se mantiene intensa y uniforme a lo largo de las distintas semanas de gestación. En la región

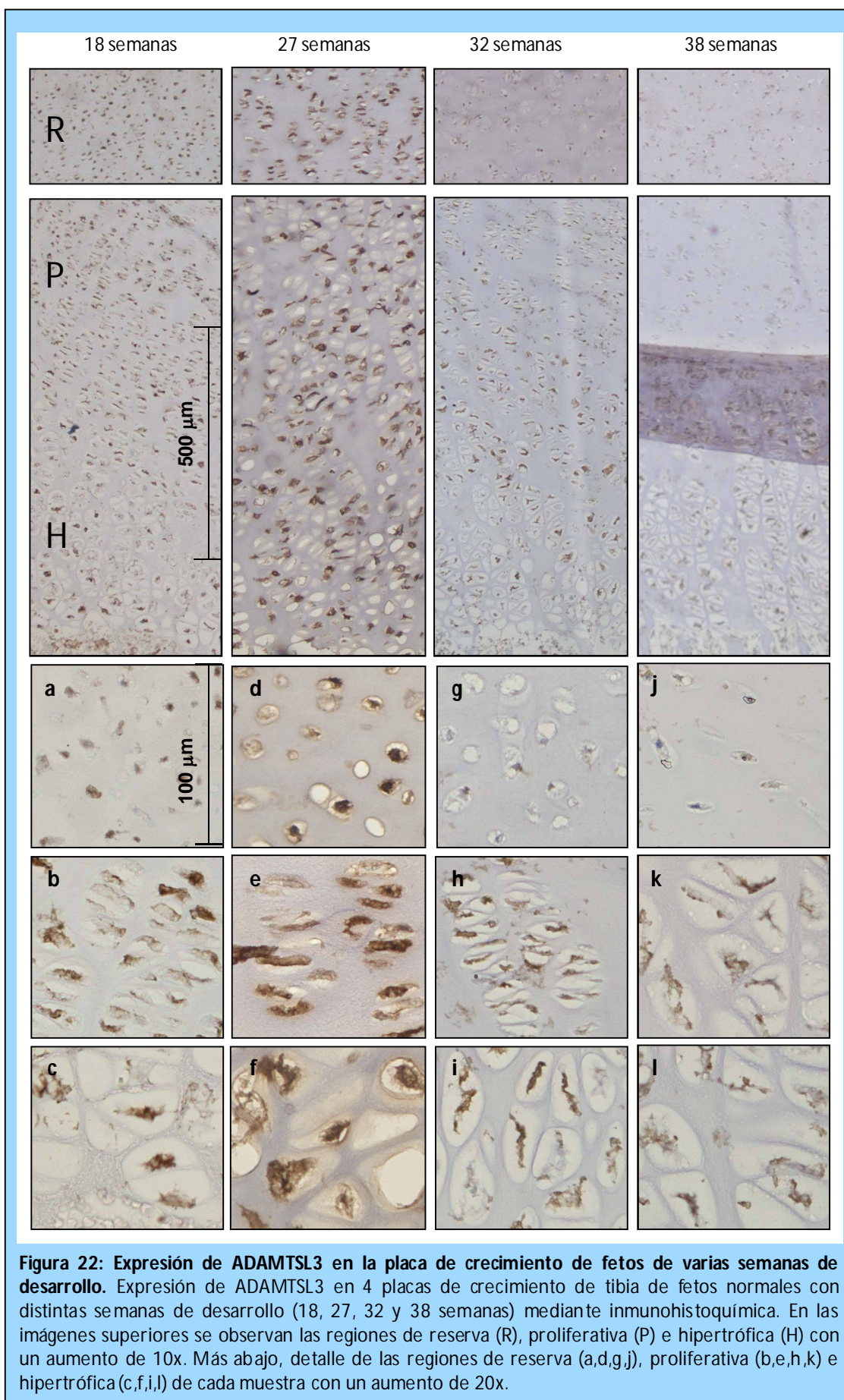
proliferativa, la expresión también es uniforme aunque parece más débil. Por último, en la región hipertrófica se observa que la expresión de SHOX es menos intensa a medida que avanza el desarrollo.

Con respecto a ADAMTSL3 se puede observar que su expresión en la región de reserva va disminuyendo al avanzar el desarrollo, haciéndose muy débil en las semanas 32 y 38 de gestación (Figura 22). En las zonas proliferativa e hipertrófica se observa expresión de ADAMTSL3 en todas las semanas de desarrollo estudiadas, siendo más débil en las semanas 32 y 38 de gestación.



**Figura 21: Expresión de SHOX en la placa de crecimiento de fetos de varias semanas de desarrollo.** Expresión de SHOX en 4 placas de crecimiento de tibia de fetos normales con distintas semanas de desarrollo (18, 27, 32 y 38 semanas) mediante inmunohistoquímica. En las imágenes superiores se observan las regiones de reserva (R), proliferativa (P) e hipertrófica (H) con un aumento de 10x. Más abajo, detalle de las regiones de reserva (a,d,g,j), proliferativa (b,e,h,k) e hipertrófica (c,f,i,l) de cada muestra con un aumento de 20x.





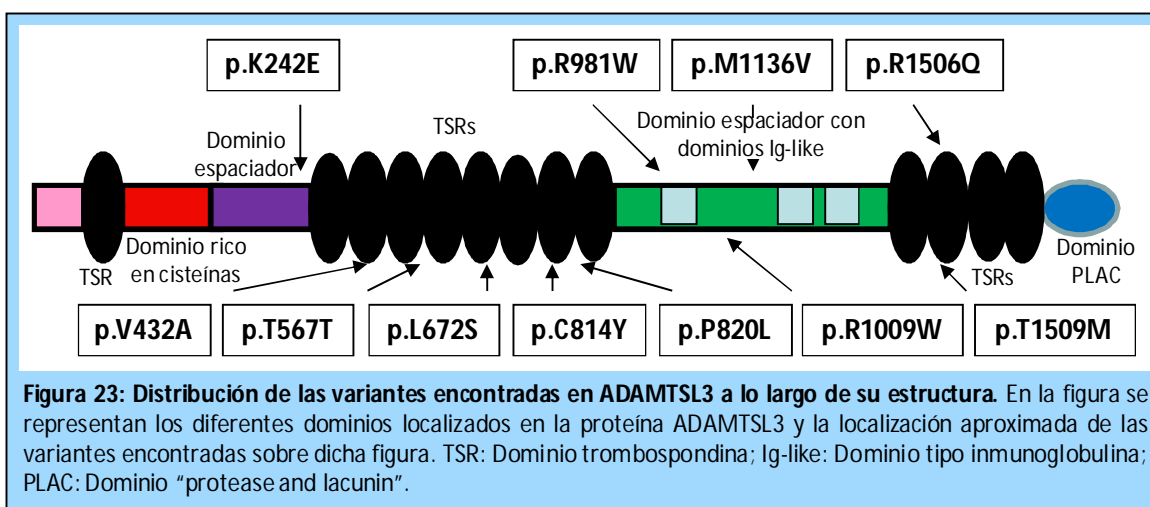
## 1.6. Rastreo de mutaciones en *ADAMTSL3*

Se ha realizado un rastreo de mutaciones puntuales y deleciones/duplicaciones en *ADAMTSL3* en dos cohortes de pacientes diferentes, una formada por 116 pacientes con DLW, y otra por 175 pacientes con TBI. En ambas cohortes se ha excluido previamente la presencia de defectos en *SHOX* o en sus regiones reguladoras.

### 1.6.1. Rastreo de mutaciones puntuales y pequeñas deleciones/inserciones

El rastreo de mutaciones puntuales y pequeñas deleciones o inserciones en el gen *ADAMTSL3* se ha llevado a cabo mediante HRM y/o secuenciación directa.

Se han encontrado 11 variantes, todas ellas en heterocigosis, no descritas previamente (Figura 23), cinco se han detectado en pacientes con DLW y seis en pacientes con TBI. Las características moleculares, cosegregación con el fenotipo, frecuencia alélica en controles y predicción de patogenicidad de cada una de las nuevas variantes se detallan en la tabla 4. Igualmente, en la tabla 5 se indican las características clínicas de los pacientes en los que se han identificado las variantes. A continuación se analiza cada variante individualmente y en más detalle.



	Familia	Variante	Exón	Cambio de aminoácido	Dominio afectado	Cosegregación	Origen étnico	Frec. en controles del mismo origen étnico	Exome Variant Server		Predicción de patogenicidad		Alamut
									Frec. en controles europeo-americanos	Frec. en controles afro-americanos	Polyphen	Mutation Taster	Implicación en splicing
DLW	1	c.724A>G	7	p.K242E	Dominio espaciador 1	No concluyente	Afro-Caribeño	3/142*	3/8597	133/4273	Posiblemente patológico 0,787	Patológico 0,95	NO
	2	c.2441G>A	19	p.C814Y	TSR-8	No concluyente	Español	5/350	3/8597	2/4404	Probablemente patológico 1,000	Patológico 0,99	NO
	3	c.2941C>T	21	p.R981W	Módulo Ig-like 1 (Igl-1)	No	Español	1/192	26/8574	3/4403	Probablemente patológico 0,998	Patológico 0,57	NO
	4	c.3406A>G	21	p.M1136V	Espaciador entre Igl-1 y Igl-2	Si	Español	0/368	0	0	Benigno 0,000	Polimorfismo 0,99	NO
	5	c.4517G>A	27	p.R1506Q	TSR 11	No concluyente	Mejicano-Español	0/140;0/192	1/8597	0/4406	Probablemente patológico 0,999	Patológico 0,99	NO
TBI	6	c.1295T>C	13	p.V432A	TSR-3	No	Español	0/350	4/8596	0/4406	Probablemente patológico 0,999	Patológico 0,99	NO
	7	c.2015T>C	17	p.L672S	TSR-6	No concluyente	Español	0/350	0	0	Probablemente patológico 0,964	Polimorfismo 0,99	NO
	8	c.2459C>T	19	p.P820L	Entre TSR-8 y TSR-9	-	Español	0/350	0	0	Probablemente patológico 1,000	Patológico 0,99	NO
	9	c.3025A>T	21	p.R1009W	Entre Ig-1 e Ig-2	-	Español	0/350	0	0	Probablemente patológico 0,993	Polimorfismo 0,99	NO
	10	c.4526C>T	27	p.T1509M	TSR-11	Si	Español	0/349	0	0	Benigno 0,022	Polimorfismo 0,99	NO
	11	c.1701G>A	16	p.T567T	Entre TSR-4 y TSR-5	-	Español	0/350	0	0	--	--	NO

**Tabla 4: Características de las variantes encontradas en el gen *ADAMTSL3* en pacientes diagnosticados con DLW o TBI.** En la tabla se muestran las variantes que se han encontrado en los pacientes con DLW (1-5) o TBI (6-11) analizados. Para cada mutación se indica la nomenclatura con respecto al ADN complementario (NM\_207517.2) y a la proteína, también se indican el exón, el aminoácido y dominio afectado. Además se indica si hay cosegregación de la variante con el fenotipo, el origen étnico del paciente y la frecuencia de cada cambio en individuos control, del mismo origen étnico que el paciente, analizados. Los individuos control españoles analizados en el laboratorio son los únicos de los que se sabe que presentan estatura normal. \*También se analizaron 350 alelos de individuos control de origen español, ninguno de ellos presentaba el cambio p.K242E. También se indica la frecuencia de cada cambio en individuos europeo-americanos y afro-caribeños y una predicción del grado de patogenicidad y de la posible implicación de cada variante en el splicing de *ADAMTSL3*, según las herramientas bioinformáticas *Exome variant server*, *Polyphen* y *Mutation Taster* y *Alamut*, respectivamente. El programa Alamut v2.0 reúne a las herramientas informáticas de predicción de splicing: *Human Splicing Finder*, *Splice Site Finder-Like*, *MaxEntScan*, *NNSPLICE* y *Gene Splicer*. La puntuación que otorgan las bases de datos *Polyphen* y *Mutation Taster* a cada predicción indica el grado de patogenicidad y el grado de certeza de la predicción, respectivamente, siendo 1 el máximo para ambas. El código de colores también indica el grado de patogenicidad, siendo el rojo el más patológico y el verde el menos patológico.



Familia	Cambio de aminoácido	Sexo	Origen étnico	Diagnóstico	Talla (DE*)	Deformidad de Madelung (SI/NO)	Otras características clínicas
1	p.K242E	Mujer	Afro-Caribeño	DLW	-1,8	SI	
2	p.C814Y	Hombre	Español	DLW	-1,51	SI	Deformidad de Madelung unilateral. Cubitus valgus
3	p.R981W	Hombre	Español	DLW	-3,7	NO	Madre con deformidad de Madelung
4	p.M1136V	Mujer	Español	DLW	-2,8	NO	Madre con deformidad de Madelung
5	p.R1506Q	Mujer	Mejicano-Español	DLW	0,52	SI	Sinostosis de radiocubital unilateral
6	p.V432A	Mujer	Español	TBI	-3,03	NO	
7	p.L672S	Mujer	Español	TBI	-2,09	NO	
8	p.P820L	Mujer	Español	TBI	-2,64	NO	
9	p.R1009W	Mujer	Español	TBI	-2,3	NO	
10	p.T1509M	Hombre	Español	TBI	ND	NO	Extremidades inferiores más cortas
11	p.T567T	Mujer	Español	TBI	-3	NO	

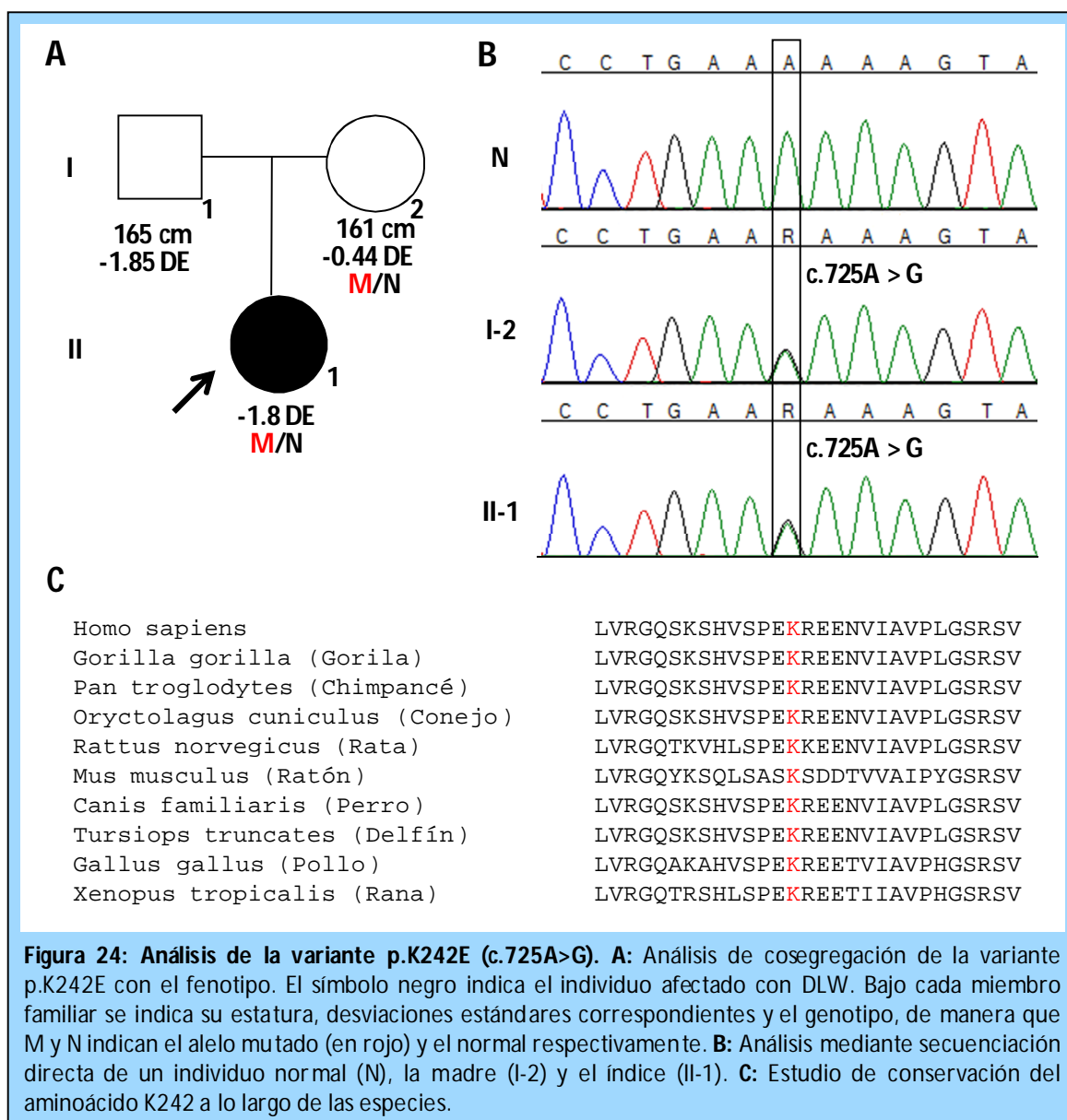
**Tabla 5: Características clínicas de los pacientes en los que se han encontrado variantes en ADAMTSL3.** En la tabla se indica, para cada variante, el sexo y origen étnico del índice, el diagnóstico con el que entró en la cohorte de estudio (DLW: Discondrosteosis de Leri-Weill; TBI: Talla Baja Idiopática), su talla en Desviaciones Estándar (DE), la presencia o no de la deformidad de Madelung, y otras características clínicas relevantes. (\*)Las DE se calcularon teniendo en cuenta la talla, edad y origen étnico del índice mediante distintas herramientas informáticas: <http://www.webpediatrica.com/endocrinoped/antropometria.php>; <http://www.magicfoundation.org/www/docs/7/growth-charts>. (ND: No descrito)

### 1.6.1.1. Análisis de nuevas variantes en ADAMTSL3

#### 1.6.1.1.1. Familia 1: variante c.724A>G; p.K242E

La variante c.724A>G de ADAMTSL3 da lugar a la variante p.K242E, que se ha encontrado en una paciente de origen afro-caribeño diagnosticada con DLW (Tabla 5). La paciente fue operada para corregir la deformidad de Madelung que presentaba. El análisis de cosegregación no es concluyente (Figura 24), ya que la madre es portadora de la variante pero tiene talla normal y no presenta la deformidad de Madelung. En el análisis de individuos control vimos que la variante c.724A>G tiene un identificador de SNP (rs112527144) asociado con una frecuencia alélica de 3/142 (2,1%) en nuestra cohorte de individuos afro-caribeños, y de 133/4273 (3,1%) en población afro-americana según EVS (*Exome Variant Server*) (Tabla 4). La frecuencia alélica de esta variante también se analizó en un grupo de 350 ADNs de individuos españoles de estatura normal y no se encontró en ninguno de ellos. La sustitución de la lisina (K) por el ácido glutámico (E) implica un cambio de polaridad en la proteína, ya que se substituye un residuo básico por uno ácido. Este residuo se encuentra en el dominio espaciador 1 de ADAMTSL3. El análisis de conservación filogenética, indica que se trata de un residuo muy conservado (Figura 24). En cuanto a la

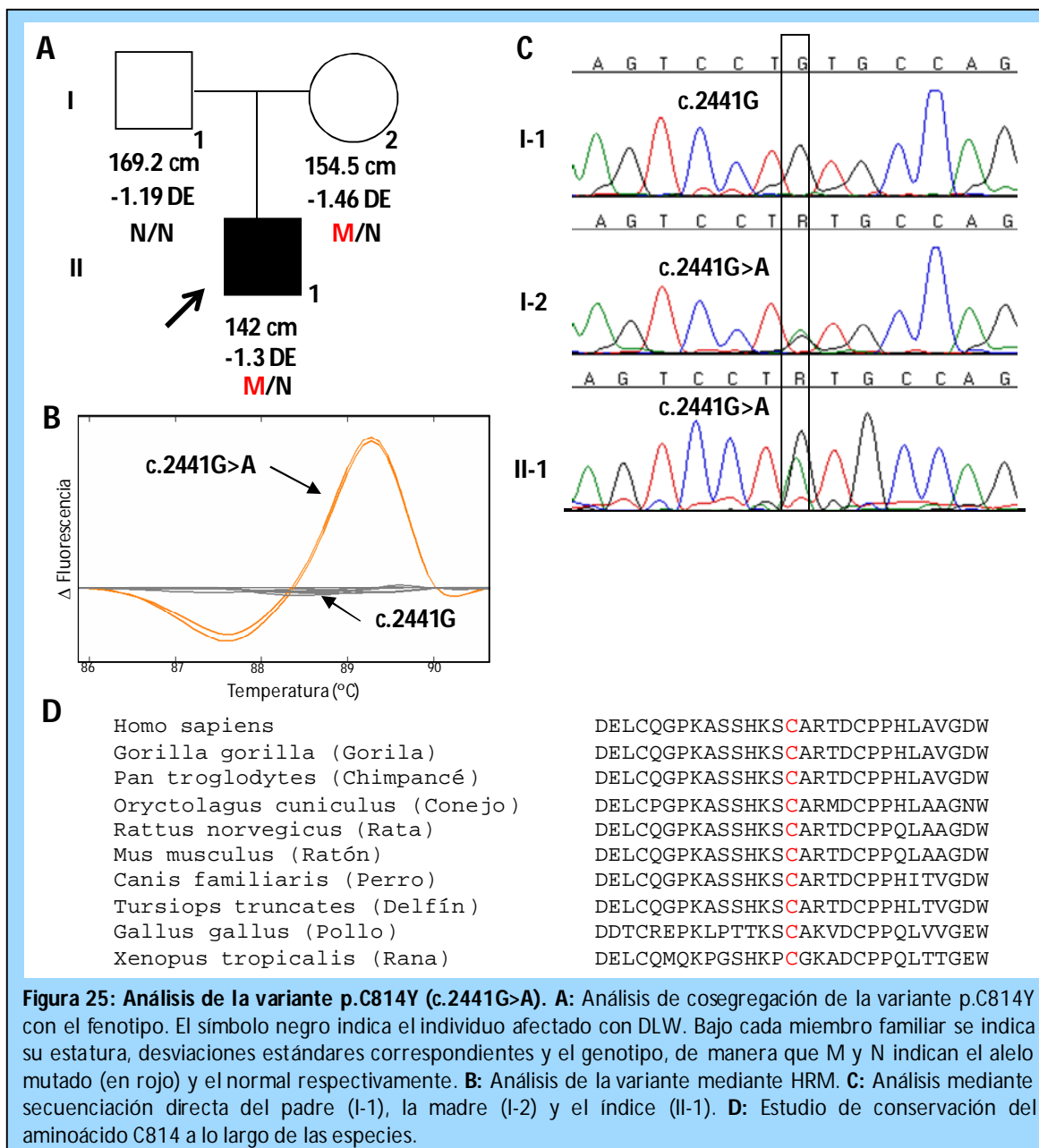
predicción de patogenicidad, ambas herramientas bioinformáticas, *Polyphen* y *MutationTaster*, coinciden en que esta variante podría ser patogénica (Tabla 4).



#### 1.6.1.1.2. Familia 2: variante c.2441G>A; p.C814Y

La variante c.2441G>A (p.C814Y) se ha identificado en un paciente de origen español diagnosticado con DLW por presentar la deformidad de Madelung de forma unilateral (Tabla 5). El análisis de cosegregación no es concluyente, ya que todos los miembros familiares presentan una talla normal, y a pesar de que la madre es portadora del cambio, ninguno de los padres presenta la deformidad de Madelung (Figura 25). La variante c.2441G>A tiene un identificador de SNP asociado, rs143157214, con una frecuencia alélica de 3/8597 (0,03%) alelos de individuos de origen europeo-americano según EVS, y de 5/350 individuos españoles de estatura normal (1,4%)

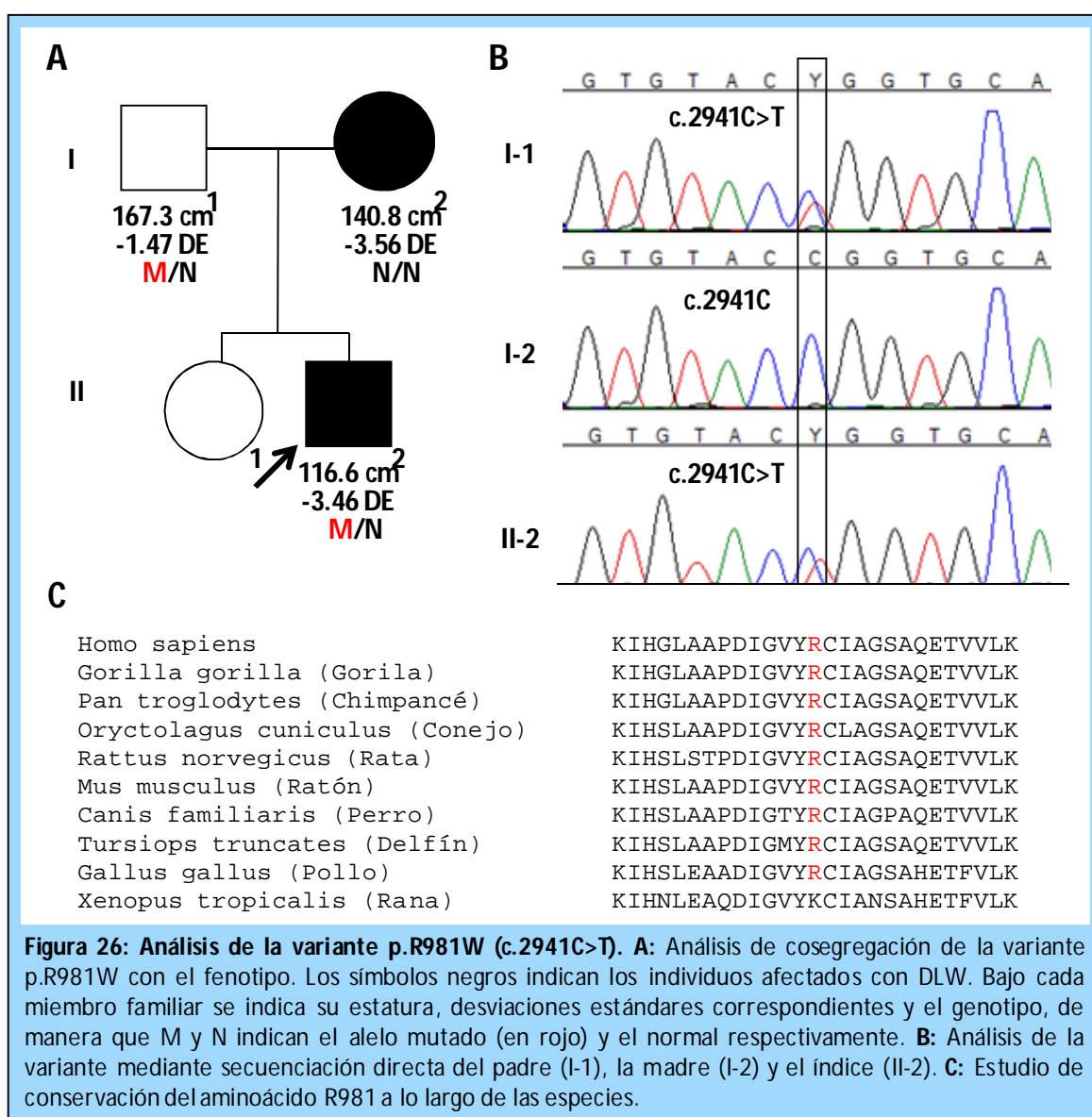
(Tabla 4). El cambio de cisteína (C) por tirosina (T) implica el cambio a un aminoácido más grande y aromático. El aminoácido C814 se localiza en el octavo dominio tipo trombospondina de ADAMTSL3. El análisis de conservación muestra que se trata de un residuo filogenéticamente muy conservado (Figura 25); las herramientas bioinformáticas de predicción de patogenicidad coinciden en que la variante p.C814Y podría ser patogénica (Tabla 4).



#### 1.6.1.1.3. Familia 3: variante c.2941C>T; p.R981W

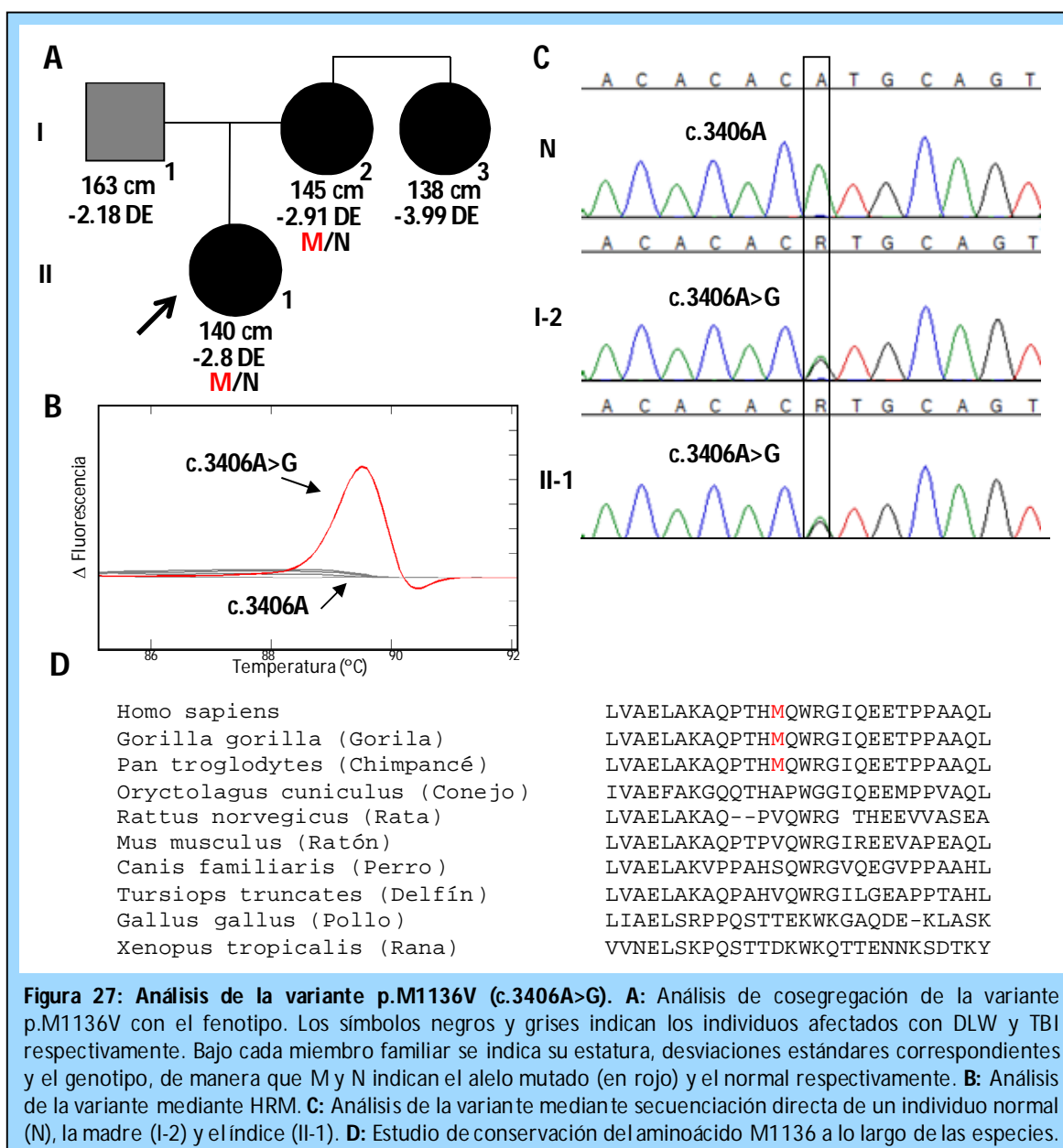
El cambio c.2941C>T da lugar a la variante p.R981W identificada en un paciente de origen español diagnosticado con DLW, que presenta una talla baja muy severa (-3.7 DE) y cuya madre presenta la deformidad de Madelung (Tabla 5). El análisis de cosegregación indica que esta

variante no cosegrega con el fenotipo de DLW en la familia, ya que la madre del paciente, diagnosticada con DLW, no es portadora de la misma (Figura 26). Además esta variante, asociada al identificador de SNPs rs140552733, ha sido identificada tanto en individuos españoles de estatura normal, como en individuos europeo-americanos, si bien, con una frecuencia alélica muy baja (0,5% y 0,3%, respectivamente) (Tabla 4). El cambio de arginina (R) por triptófano (W) implica la substitución de un aminoácido cargado positivamente (R) por uno aromático (W). Este residuo se localiza en el primer módulo de tipo inmunoglobulina de la proteína. y está muy conservado filogenéticamente (Figura 26). En cuanto a la predicción de patogenicidad, ambas herramientas bioinformáticas clasifican este cambio como probablemente patogénico.



#### 1.6.1.1.4. Familia 4: variante c.3406A>G; p.M1136V

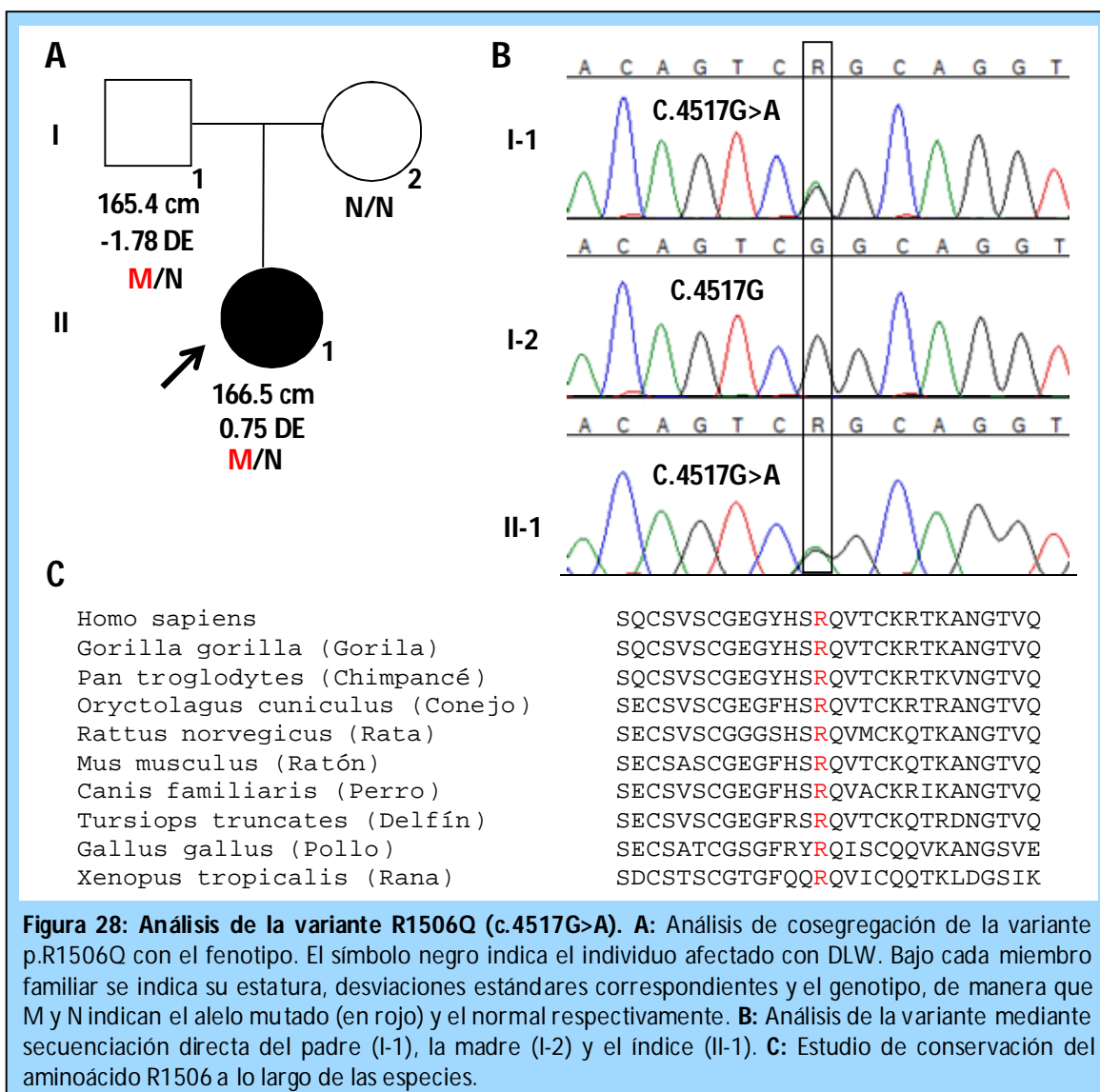
La variante c.3406A>G (p.M1136V) se ha identificado en una paciente de origen español diagnosticada con DLW (Tabla 5). Se ha observado cosegregación de la misma con el fenotipo de DLW en la familia, ya que la madre del índice presenta la variante y también está diagnosticada con DLW (Figura 27). La variante p.M1136V no se ha identificado en ninguno de los individuos españoles de estatura normal analizados, ni tampoco ha sido descrita en EVS (Tabla 4). La sustitución de metionina (M) por valina (V) podría no afectar demasiado a la proteína, ya que ambos son aminoácidos neutros no polares, aunque la valina tiene un tamaño menor. Este residuo se localiza en el dominio espaciador entre el primer y segundo dominio tipo inmunoglobulina de ADAMTSL3. Según el análisis de conservación filogenética, M1136 no está



muy conservado, y de hecho, algunas especies presentan una Valina en esta posición (Figura 27). Por otro lado, tanto *Polyphen* como *MutationTaster*, clasifican este cambio como benigno (Tabla 4).

#### 1.6.1.1.5. Familia 5: variante c.4517G>A; p.R1506Q

La variante c.4517G>A (p.R1506Q) se ha encontrado en un paciente de origen mejicano-español diagnosticado con DLW (Tabla 5). El análisis de cosegregación no es informativo, ya que, aunque el padre presenta la variante y una talla al límite de la normalidad, ninguno de los padres presenta defectos esqueléticos (Figura 28). Aunque la variante c.4517G>A tiene un identificador de SNP asociado (rs140462473), no ha sido detectada en ninguno de los individuos control mejicanos (n=140) o españoles (n=192), respectivamente. Con respecto al registro de EVS, este cambio se ha descrito en un único alelo (1/8597) del total de los 4299 individuos de origen

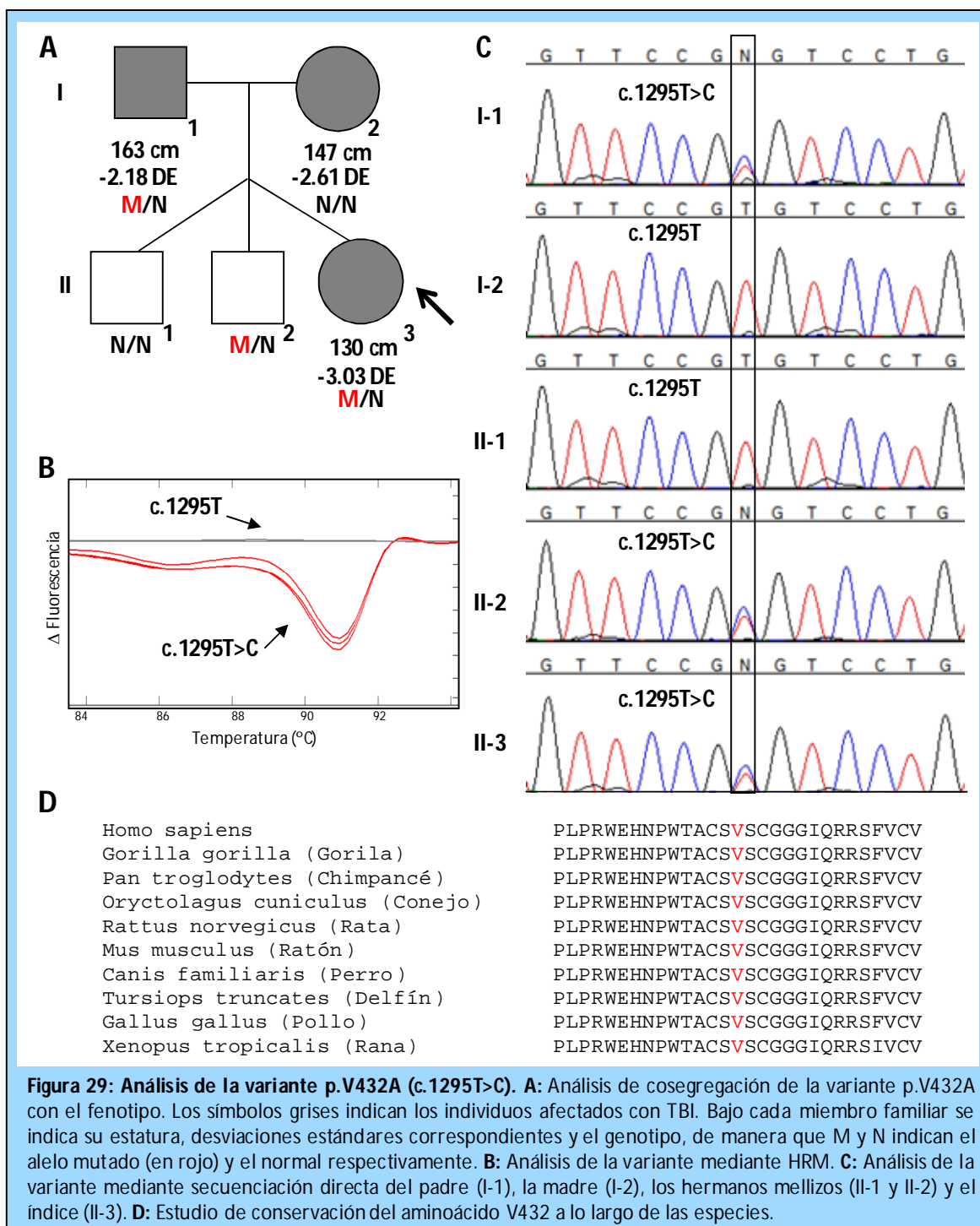


europeo-americano registrados en EVS (Tabla 4). Se desconoce la talla del individuo que presenta la variante p.R1506Q. El cambio de glutamina (Q) por arginina (R) implica el cambio de un residuo neutro por uno cargado positivamente. Este residuo se localiza en el dominio tipo trombospondina 11 de la proteína. El estudio de conservación de R1506 muestra que está totalmente conservado a lo largo de la evolución (Figura 28), y las herramientas bioinformáticas de predicción de patogenicidad coinciden en que el cambio p.R1506Q podría ser patogénico (Tabla 4).

#### 1.6.1.6. Familia 6: variante c.1295T>C; p.V432A

La sustitución c.1295T>C da lugar a la variante p.V432A, identificada en una paciente trilliza de origen español diagnosticada con TBI (Tabla 5). El análisis de cosegregación indica, *a priori*, que el cambio no cosegrega con el fenotipo en la familia, ya que uno de los hermanos del caso índice es portador de la variante pero no presenta talla baja. Sin embargo, la falta de información clínica adicional sobre los otros dos trillizos nos impide por el momento descartar que haya cosegregación (Figura 29). La variante c.1295T>C (rs141912251) no se ha detectado en el grupo de individuos españoles de estatura normal, pero sí aparece con una frecuencia alélica muy baja (4/8596; 0,05%) en individuos europeo-americanos según EVS (Tabla 4). Si bien el cambio de valina (V) por alanina (A) no supone una alteración importante para la proteína, ya que ambos aminoácidos son pequeños y apolares, en contraste, sí parece ser un residuo importante, ya que el análisis de conservación indica que este aminoácido se ha mantenido intacto a lo largo de la evolución (Figura 29). V432 se localiza en el tercer dominio de tipo trombospondina de ADAMTSL3. Con respecto a la predicción de patogenicidad, tanto *Polyphen* como *MutationTaster* coinciden en que el cambio p.V432A sea probablemente patogénico (Tabla 4).



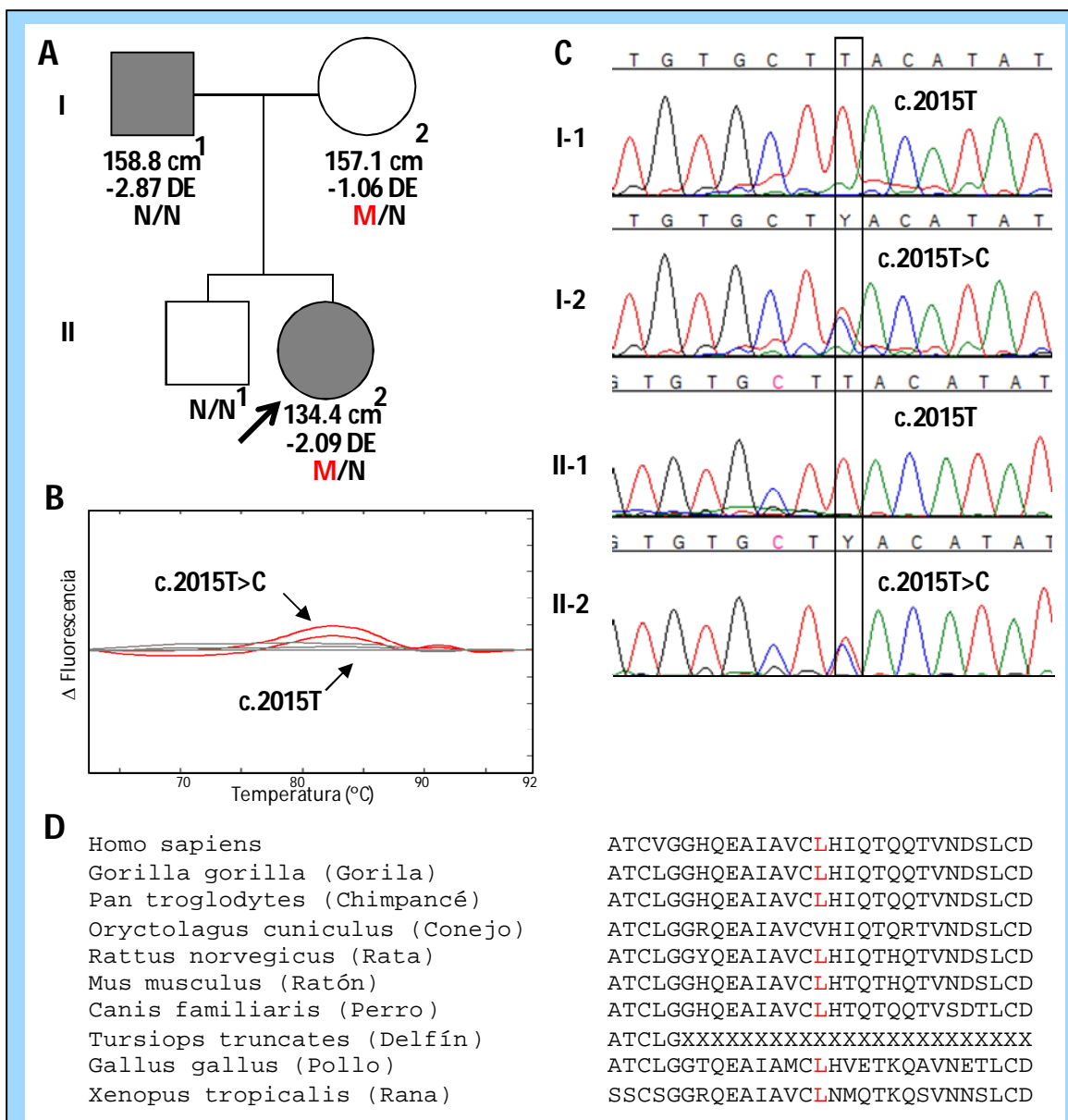


#### 1.6.1.1.7. Familia 7: variante c.2015T>C; p.L672S

La variante c.2015T>C (p.L672S) se ha encontrado en una paciente de origen español diagnosticada con TBI (Tabla 5). El análisis de cosegregación en la familia del índice no es concluyente, porque parece que la talla baja viene por la rama paterna siendo la madre la portadora del cambio (Figura 30). Esta variante no se ha detectado en el grupo de individuos españoles de estatura normal, ni se halla registrada en el EVS (Tabla 4). El cambio de Leucina (L)



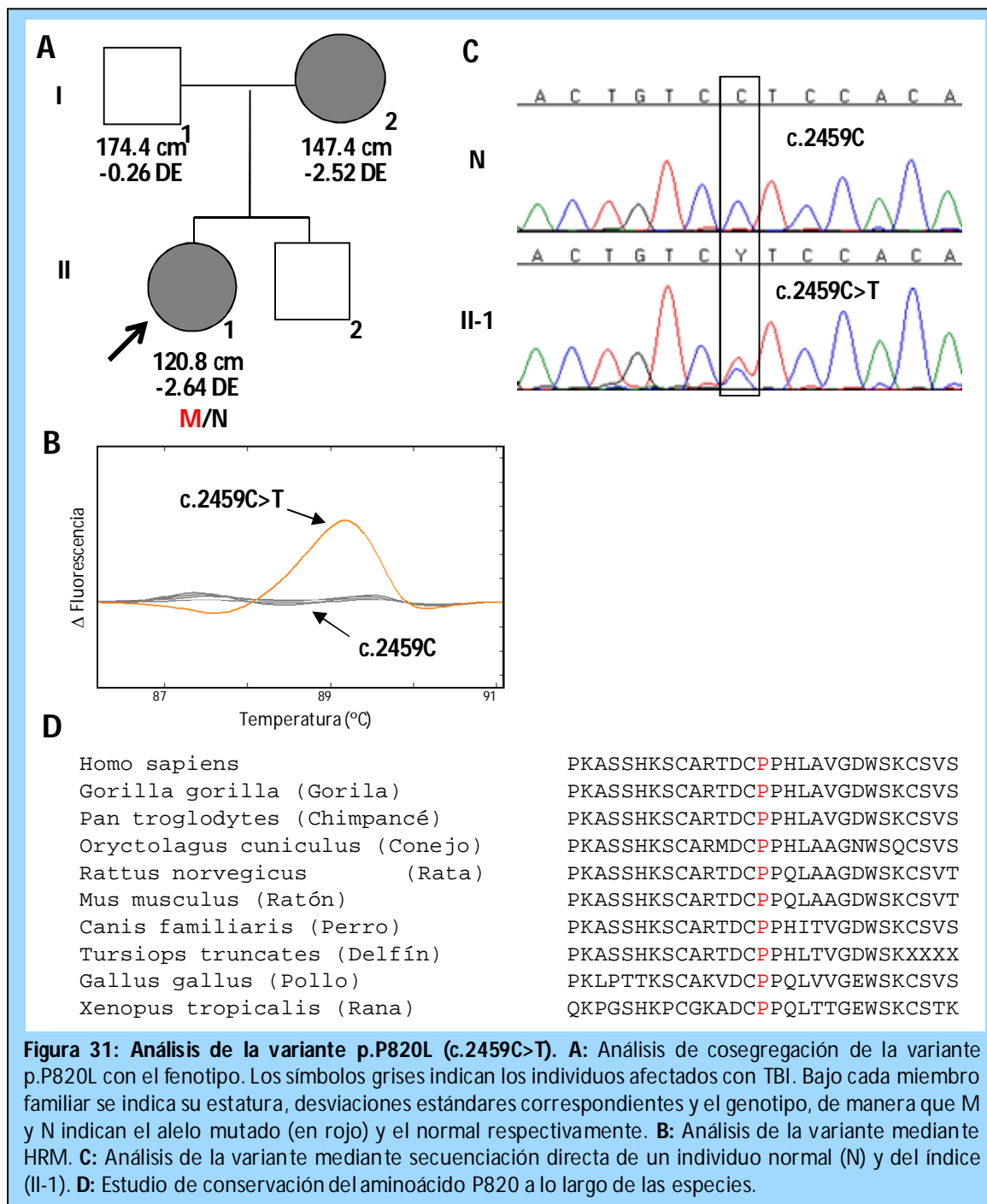
por Serina (S) implica una variación en la polaridad de la proteína, ya que se substituye un aminoácido apolar por otro polar. L672 se localiza en el sexto dominio tipo trombospondina de la proteína. El análisis de conservación indica que este residuo está moderadamente conservado (Figura 30) y con respecto a la predicción de patogenicidad, las herramientas difieren en su predicción, ya que predicen tanto que es un polimorfismo como que es probablemente patogénica, con un alto grado de certeza en ambos casos (Tabla 4).



**Figura 30: Análisis de la variante p.L672S (c.2015T>C).** **A:** Análisis de cosegregación de la variante p.L672S con el fenotipo. Los símbolos grises indican los individuos afectados con TBI. Bajo cada miembro familiar se indica su estatura, desviaciones estándares correspondientes y el genotipo, de manera que M y N indican el alelo mutado (en rojo) y el normal respectivamente. **B:** Análisis de la variante mediante HRM. **C:** Análisis de la variante mediante secuenciación directa del padre (I-1), la madre (I-2), el hermano (II-1) y el índice (II-2). **D:** Estudio de conservación del aminoácido L672 a lo largo de las especies.

### 1.6.1.1.8. Familia 8: variante c.2459C>T; p.P820L

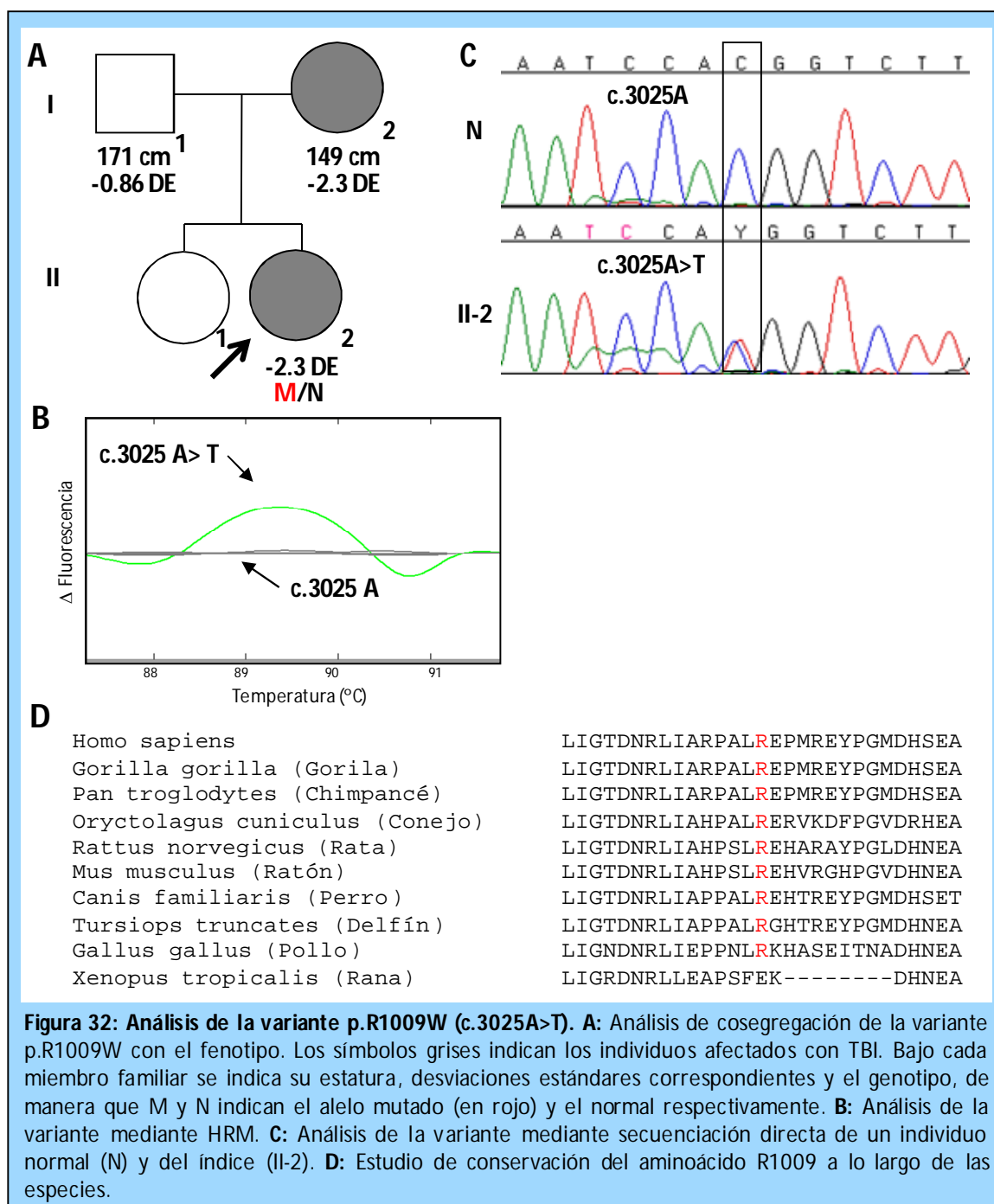
La variante c.2459C>T (p.P820L) se ha identificado en una paciente de origen español diagnosticada con TBI (Tabla 5). El análisis de cosegregación no se ha podido llevar a cabo por falta de muestra de los familiares (Figura 31). La variante p.P820L no se ha detectado en el grupo de individuos españoles de estatura normal ni está descrita en el EVS (Tabla 4). Dicho cambio, de prolina (P) por leucina (L), podría afectar a la estructura secundaria de la proteína, ya que la prolina es un aminoácido que interrumpe ciertas estructuras proteicas por no tener libertad de



giro. Este residuo se localiza entre el octavo y noveno dominio tipo trombospondina de la proteína. El análisis de conservación filogenética muestra que este residuo está muy conservado a lo largo de las especies (Figura 31), y las herramientas bioinformáticas coinciden en que la variante p.P820L muy probablemente sea patogénica (Tabla 4).

#### **1.6.1.1.9. Familia 9: variante c.3025A>T; p.R1009W**

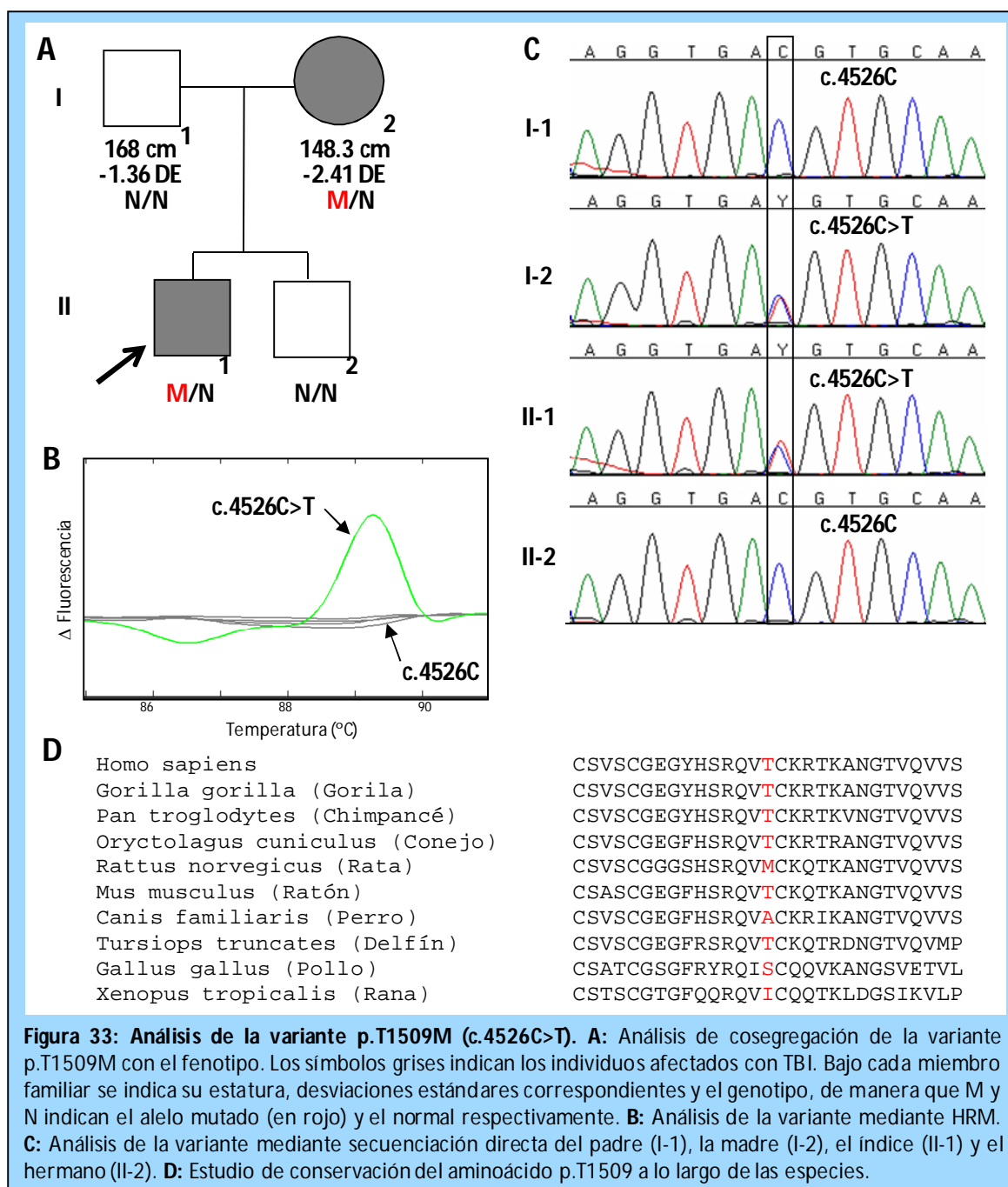
La variante c.3025A>T (p.R1009W) se ha identificado en una paciente de origen español diagnosticada con TBI (Tabla 5). El análisis de cosegregación no se ha podido llevar a cabo por no disponer de la muestra de ADN de los familiares (Figura 32). La variante c.3025A>T no ha sido detectada en el grupo de individuos españoles de estatura normal y tampoco se halla registrada en EVS (Tabla 4). La sustitución de arginina (R) por triptófano (W), implica el cambio de un aminoácido cargado positivamente (R) por uno aromático (W). El análisis de conservación sugiere que este residuo ha de ser funcionalmente importante, ya que se trata de un residuo filogenéticamente muy conservado durante la evolución (Figura 32). R1009 se localiza entre el primer y segundo dominio tipo inmunoglobulina. En cuanto a la predicción de patogenicidad de la variante p.R1009W, las herramientas bioinformáticas difieren en su predicción: polimorfismo (Mutation Taster); probablemente patogénica (PolyPhen2.2) (Tabla 4).



#### 1.6.1.1.10. Familia 10: variante c.4526C>T; p.T1509M

La variante c.4526C>T (p.T1509M) se ha identificado en una paciente de origen español diagnosticada con TBI (Tabla 5). El análisis de cosegregación muestra que este cambio cosegrega con el fenotipo de talla baja en la familia del índice (Figura 33). c.4526C>T no ha sido detectado en los individuos españoles de estatura normal y no se haya registrado en EVS (Tabla 4). La sustitución de tirosina (T) por metionina (M) podría afectar a la proteína, ya que supone el cambio de un aminoácido polar por uno apolar. T1509 se localiza en el dominio tipo trombospondina 11

de ADAMTSL3. La conservación de este aminoácido es moderada (Figura 33) y tanto *Polyphen* como *MutationTaster* pronostican que este cambio es un polimorfismo benigno (Tabla 4).



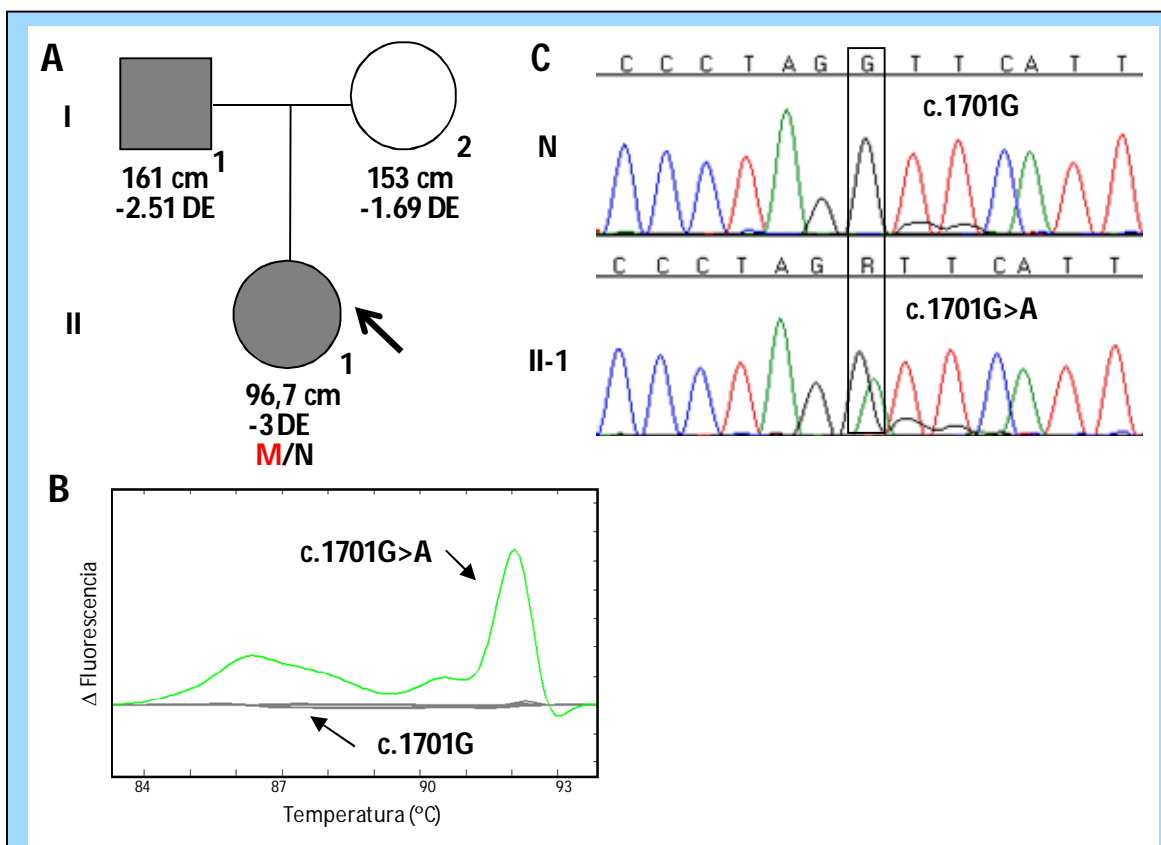
#### 1.6.1.1.11. Familia 11: variante c.1701G>A; p.T567T

El cambio c.1701G>A da lugar a la variante sinónima p.T567T, identificada en una paciente de origen español diagnosticada con TBI (Tabla 5). El análisis de cosegregación no se ha podido llevar a cabo por falta de muestra de los familiares (Figura 34). La variante está localizada entre el

cuarto y quinto dominio de tipo trombospondina de ADAMTSL3. Esta variante no está presente ni en el grupo de individuos españoles de estatura normal, ni en EVS (Tabla 4).

A pesar de ser un cambio sinónimo, que no da lugar a un cambio de aminoácido en la proteína, puede tener consecuencias patológicas en la proteína, ya que el cambio de triplete del ARN mensajero podría alterar el *splicing*. Para analizar si el cambio c.1701G>A podría afectar al patrón de *splicing* de la proteína, utilizamos el programa Alamut v2.0, que integra la predicción de cinco bases de datos independientes para pronosticar posibles alteraciones en el *splicing*. La predicción fue, por unanimidad, que este cambio no afecta al *splicing*.

En resumen, no descartamos que este cambio pueda ser patogénico y afectar de forma negativa a la proteína, además su ausencia en los individuos de EVS y en individuos españoles de estatura normal apoya esta teoría. El futuro análisis de cosegregación ayudará a aclarar la posible patogenicidad de este cambio.



**Figura 34: Análisis de la variante p.T567T (c.1701G>A).** **A:** Análisis de cosegregación de la variante p.T567T con el fenotipo. Los símbolos grises indican los individuos afectados con TBI. Bajo cada miembro familiar se indica su estatura, desviaciones estándares correspondientes y el genotipo, de manera que M y N indican el alelo mutado (en rojo) y el normal respectivamente. **B:** Análisis de la variante mediante HRM. **C:** Análisis de la variante mediante secuenciación directa de un individuo normal (N) y del índice (II-1).

Durante el análisis de las secuencias de *ADAMTSL3*, se han encontrado además varios cambios intrónicos, tanto descritos como no descritos en la población general. Para todos ellos, se ha analizado al nivel bioinformático su posible efecto sobre el *splicing* de *ADAMTSL3* (Tabla 6). Ninguno de estos cambios parece afectar al patrón de *splicing*.

Variante	nº de pacientes DLW	nº de pacientes TBI	Nº identificador de SNP	Predicción de alteración de <i>splicing</i>
c.189+43G>A	1		ND	NO
c.70-39C>G		1	rs148277903	NO
c.317+38T>G	1		rs189606595	NO
c.190-3T>C	6	6	rs75442575	NO
c.728-9C>G		1	rs149499512	NO
c.802+63A>T		1	ND	NO
c.802+67A>C	2		ND	NO
c.961-103G>A	1	1	rs117559716	NO
c.1072+48A>G	7	13	rs112182320	NO
c.1211+111C>T	1		rs150822565	NO
c.1211+98C>T	1	1	ND	NO
c.1212-63G>A	1		ND	NO
c.1262+200C>T		1	ND	NO
c.1262+206G>A	1		rs190415942	NO
c.1468-82G>C	4	3	rs78494571	NO
c.2117+54C>T		1	rs79192918	NO
c.2310+37T>C	1		rs149497156	NO
c.2490+22A>G		1	rs74026625	NO
c.2490+89C>A		1	ND	NO
c.2644+13T>C		1	ND	NO
c.2644+136G>A	1		ND	NO
c.2645-53T>A	1		ND	NO
c.3845-56T>C	1		rs117478563	NO
c.4156+51A>G	1		rs73443196	NO
c.4156+58C>T	1		rs73443198	NO
c.4273+31A>G	1		ND	NO
c.4273+56G>T	2		rs142048587	NO
c.4656+35A>G	1		rs200548817	NO
c.4656+96G>A	2	1	rs189305833	NO
c.4657-45G>A	3	2	rs79074742	NO

**Tabla 6: Variantes intrónicas que se han detectado en *ADAMTSL3*.** En la tabla se indica el nombre de cada variante y el número de pacientes con discondrosteosis de Leri-Weill (DLW) y talla baja idiopática (TBI) que la presentan. Si la variante está descrita se indica su número de identificador de SNP, también se indica la predicción de alteración de *splicing* utilizando el programa Alamut v2.0 que integra distintas herramientas informáticas (*Human Splicing Finder*, *Splice Site Finder-Like*, *MaxEntScan*, *NNSPLICE* y *Gene Splicer*). (ND: No descrito)

### 1.6.2. Análisis de deleciones y duplicaciones en el gen *ADAMTSL3*

Para realizar la búsqueda de deleciones y duplicaciones en el gen *ADAMTSL3* se ha diseñado y puesto a punto un ensayo de MLPA. Las sondas diseñadas son complementarias a las secuencias

de algunos exones y a secuencias de los flancos 5' y 3' del gen, así como a otras regiones control que se encuentran en un cromosoma diferente al 15.

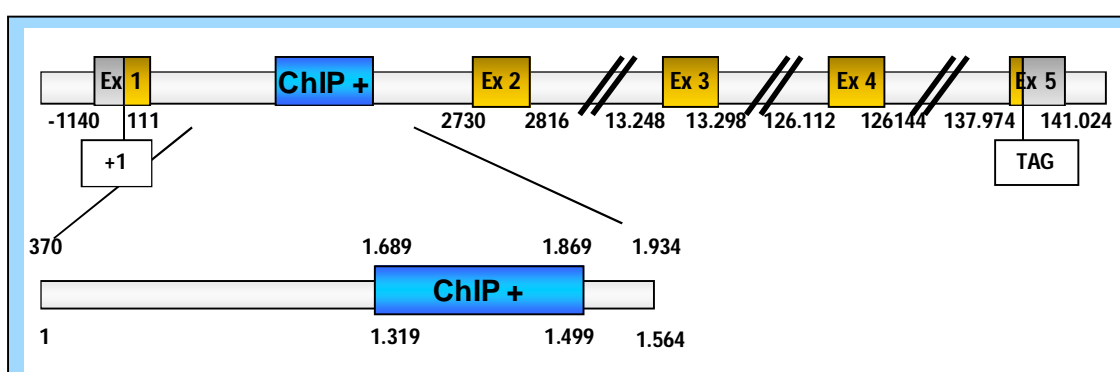
No se ha identificado ninguna delección o duplicación en las cohortes de pacientes analizadas mediante el ensayo de MLPA realizado.



## 2. HMGA2

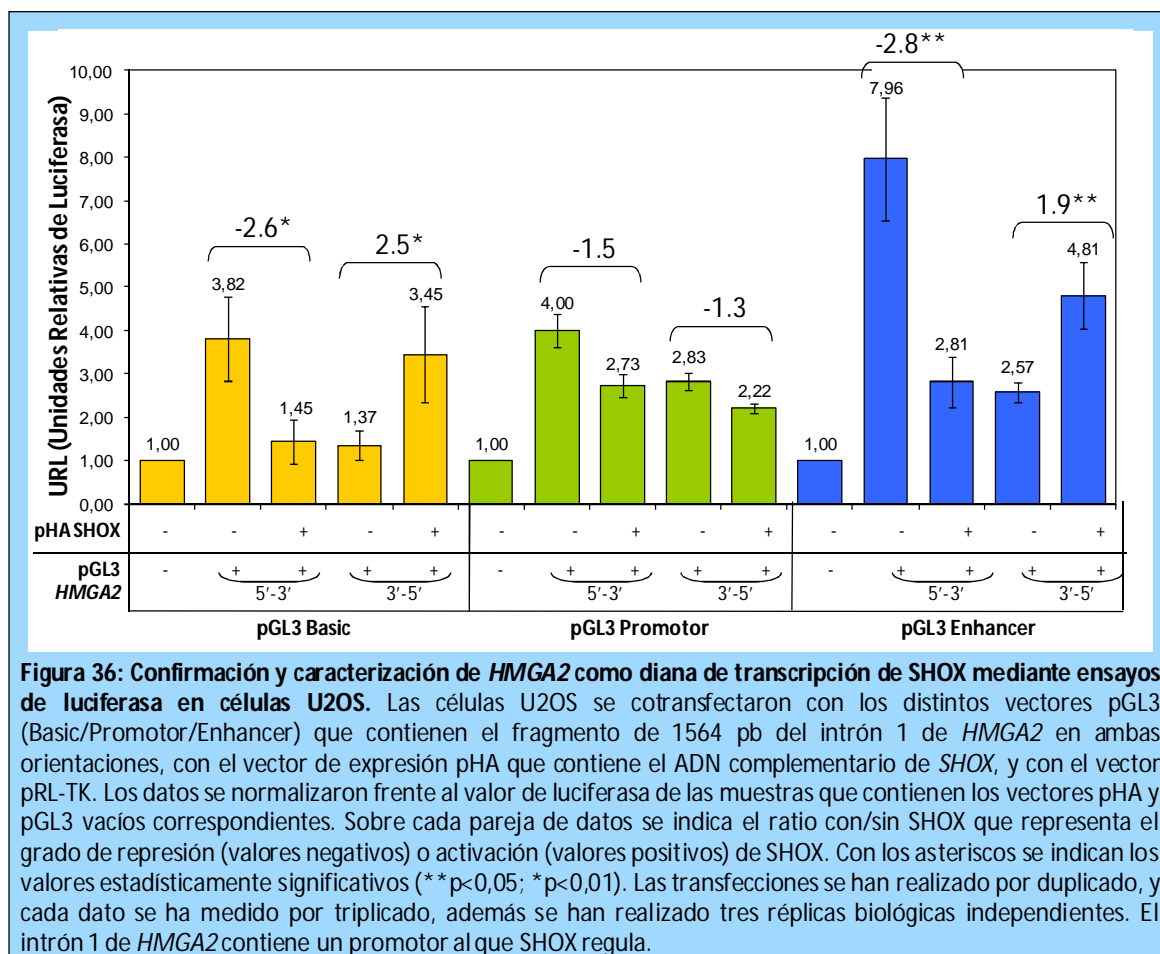
### 2.1. Caracterización de *HMGA2* como diana de transcripción de SHOX

La confirmación y caracterización del gen *HMGA2* como diana de transcripción de SHOX, se llevó a cabo mediante ensayos de luciferasa en células U2OS en los que se comparó el efecto de la presencia o ausencia de SHOX sobre el fragmento del intrón 1 de *HMGA2* que dio positivo en el ensayo de ChIP on Chip y parte de su secuencia flanqueante (1564 pb) (Figura 35). Este fragmento se ha clonado en ambas orientaciones en los tres tipos de vectores pGL3: Basic, Promotor y Enhancer.



**Figura 35: Esquema del fragmento de 1564 pb del intrón 1 de *HMGA2* clonado en los tres vectores pGL3.** En la figura se muestra parte de la organización genómica de *HMGA2*, y en detalle el fragmento que contiene la parte del intrón 1 que dio positivo en el ensayo de ChIP on Chip y parte de su región flanqueante. Los números bajo cada exón indican su localización con respecto al ATG del codón de iniciación (+1), también se indica el codón de terminación (TAG), además el fragmento clonado se ha numerado de nuevo a partir de su primer nucleótido (numerado bajo la estructura).

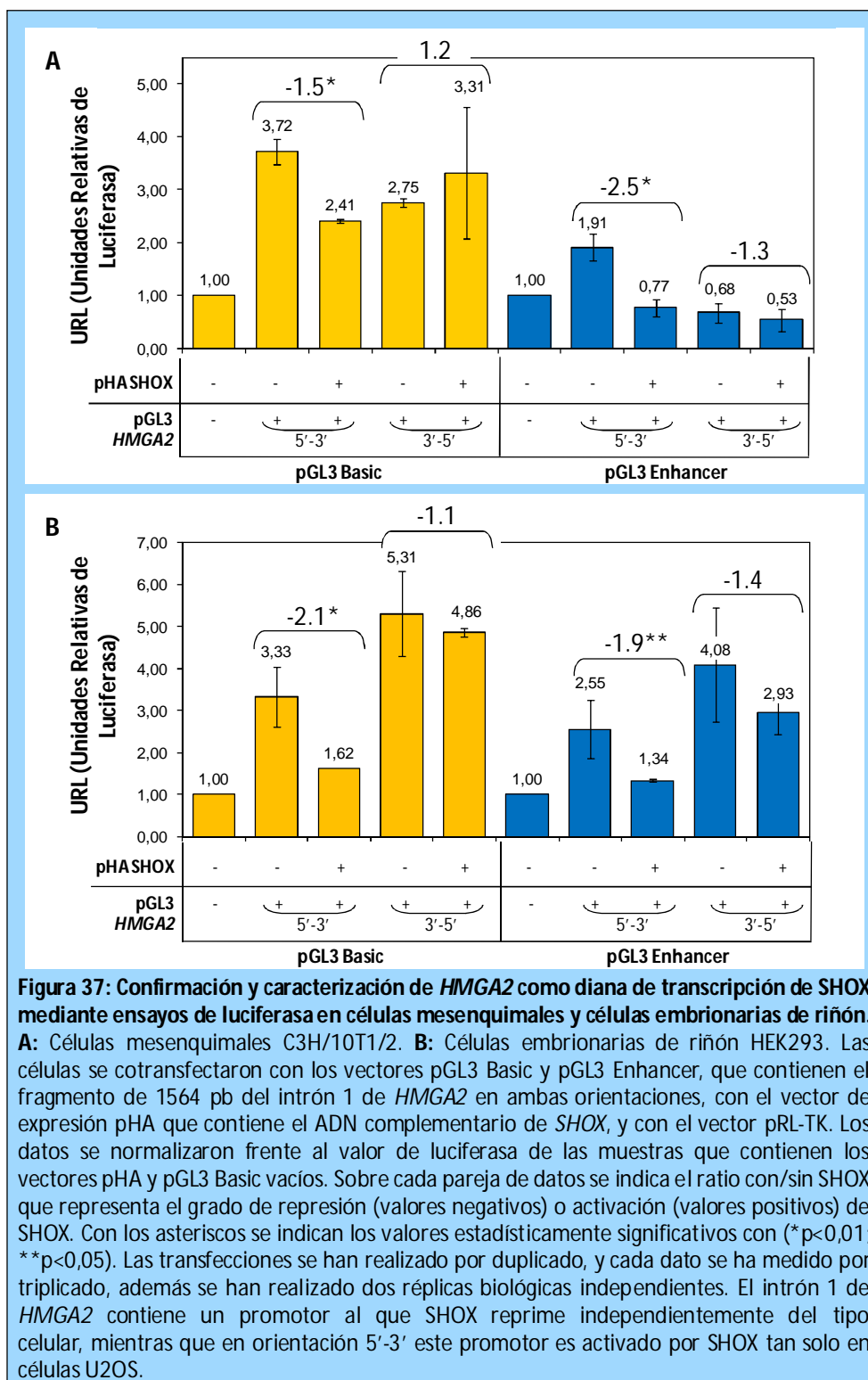
Los resultados de los experimentos de luciferasa con pGL3 Basic y con pGL3 Enhancer se correlacionan entre sí, y muestran que existe actividad promotora en el intrón 1 de *HMGA2*. Esta actividad se da en ambas orientaciones. El elemento promotor que funciona en orientación 5'-3' es reprimido por SHOX, mientras que el elemento promotor que funciona en orientación opuesta es activado por SHOX. Con respecto a pGL3 Promotor, los resultados indican que no existe ninguna secuencia de tipo *enhancer* en el fragmento de estudio (Figura 36).



### 2.1.1. Comparación de la actividad represora de *SHOX* sobre *HMGA2* en otros tipos celulares

Para comprobar si el efecto que ejerce *SHOX* sobre este fragmento del intrón 1 de *HMGA2* es dependiente del tipo celular, estos mismos ensayos de luciferasa se han repetido en células C3H/10T1/2 y HEK293, como modelo de células mesenquimales y células de otro tejido, respectivamente. En esta ocasión se ha prescindido de utilizar el vector pGL3 Promotor, ya que en el experimento anterior este vector mostró que el fragmento de estudio no contenía ninguna secuencia de tipo *enhancer*.

Los resultados de los ensayos de luciferasa en células C3H/10T1/2 (Figura 37A) y en células HEK293 (Figura 37B), muestran que la actividad promotora presente en *HMGA2* que se detectó en células U2OS sigue siendo funcional en estas líneas celulares. En orientación 5'-3' el promotor es reprimido por *SHOX*, tal y como ocurría en células U2OS. Por el contrario, en orientación 3'-5', no vemos el efecto de activación de *SHOX* que observamos en células U2OS.

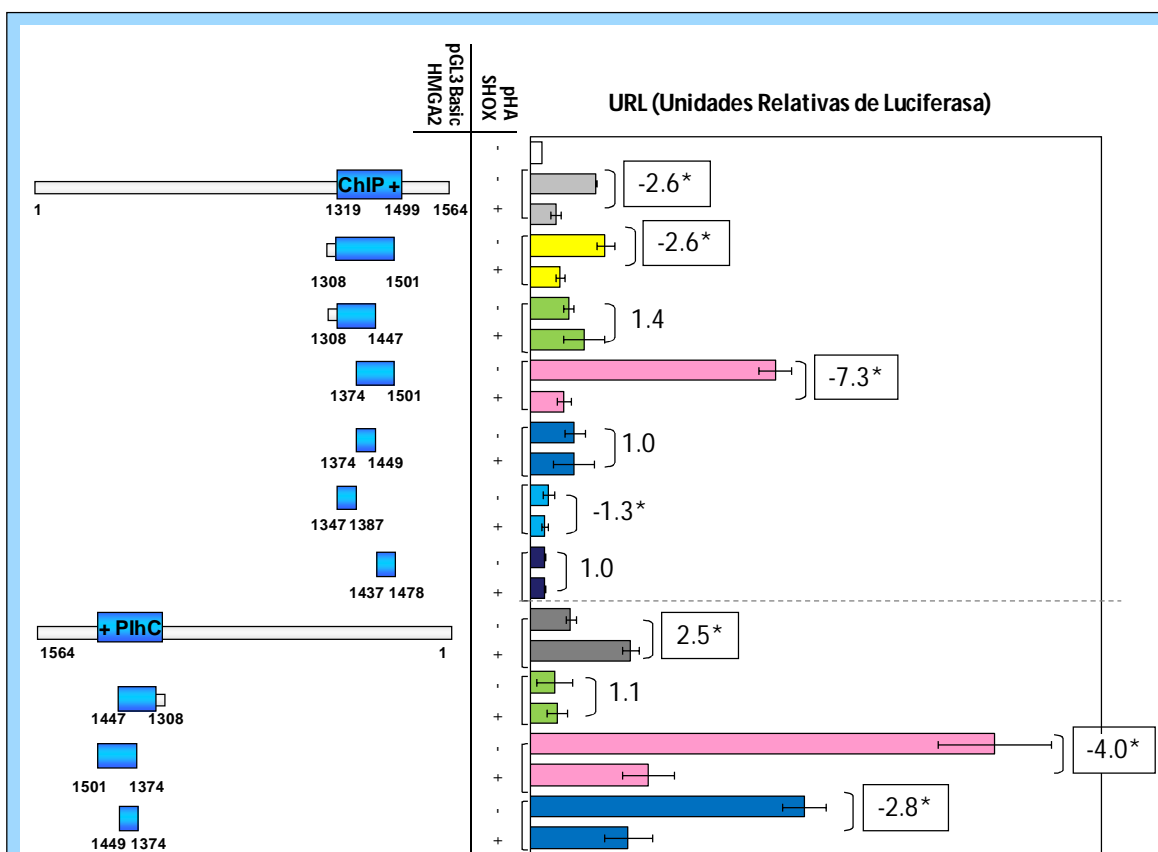


### 2.1.2. Delimitación del elemento regulador en *HMGA2*

Para acotar la región que contiene la secuencia promotora del intrón 1 de *HMGA2*, se han realizado ensayos de luciferasa con fragmentos cada vez más pequeños de dicha región (Figura 38) clonados en el vector pGL3 Basic y se han comparado los resultados en presencia y ausencia

de SHOX. Los fragmentos que se han considerado más informativos se han clonado también en orientación 3'-5'.

Los resultados muestran que, en orientación 5'-3', solo los fragmentos que abarcan los nucleótidos 1308-1501 y 1374-1501 mantienen la capacidad promotora intacta sensible a SHOX, que es capaz de ejercer un efecto de represión sobre la actividad promotora de estos fragmentos de -2.6 y -7.3 veces respectivamente (Figura 38). Es decir, la región de 127 pb, que abarca los nucleótidos 1374-1501, es la secuencia mínima en la que el elemento regulador es funcional. En orientación 3'-5' la actividad promotora se mantiene intacta en los fragmentos que abarcan los nucleótidos 1374-1501 (127 pb) y 1374-1449 (75 pb), sobre los que SHOX es capaz de ejercer un efecto de represión de -4.0 y -2.8 veces respectivamente.

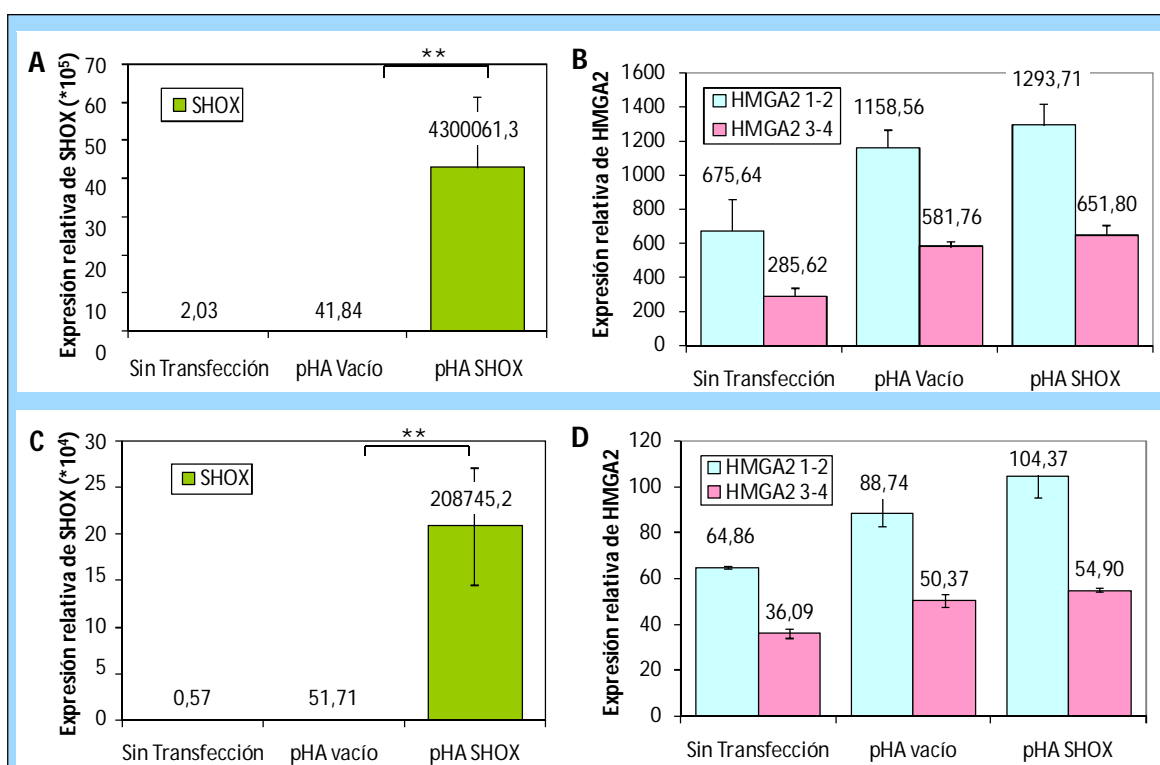


**Figura 38: Delimitación del elemento regulador presente en el intrón 1 de *HMGA2* mediante ensayos de luciferasa en células U2OS.** Las células U2OS se cotransfectaron con el vector pGL3 Basic que contiene los distintos fragmentos del intrón 1 de *HMGA2*, con el vector de expresión pHA que contiene el ADN complementario de *SHOX*, y con el vector pRL-TK. Junto al gráfico se representan de forma esquemática las distintas construcciones de *HMGA2* que se han utilizado, y bajo cada una de ellas se indican los nucleótidos contenidos. Los datos se normalizaron frente al valor de luciferasa de las muestras que contienen los vectores pHA y pGL3 Basic vacíos. Sobre cada pareja de datos se indica el ratio con/sin *SHOX* que representa el grado de represión (valores negativos) o activación (valores positivos) de *SHOX*. Con los asteriscos y recuadros se indican los valores estadísticamente significativos (\* $p < 0,01$ ). Las transfecciones se han realizado por duplicado, y cada dato se ha medido por triplicado, además se han realizado tres réplicas biológicas independientes. La línea de puntos separa los fragmentos clonados en orientación 3'-5'. ChIP+: región del intrón 1 de *HMGA2* que dio positivo en el ensayo de ChIP on Chip. En orientación 5'-3' hemos acotado el promotor a un fragmento de 127 pb (1374-1501), mientras que en orientación 3'-5' este promotor se limita a un fragmento de 75 pb (1374-1449).

En conclusión, nuestros experimentos nos han permitido acotar un fragmento de 127 pb en el intrón 1 de *HMGA2* con actividad promotora regulada negativamente por SHOX. Este promotor podría ser bidireccional o tratarse de dos promotores independientes que funcionan en ambas orientaciones.

## 2.2. Efecto de SHOX sobre la expresión endógena de *HMGA2*

Para comprobar cuál es el efecto que ejerce SHOX sobre la expresión endógena de *HMGA2* y así confirmar lo observado en los ensayos de luciferasa, se han realizado ensayos de PCR a tiempo real en células U2OS (Figura 39 A, B) y células HEK293 (Figura 39 C, D), en los que se han comparado los niveles de ARN endógeno de *HMGA2* en presencia o ausencia de SHOX. Dado que hay varios transcritos de *HMGA2* descritos y para poder detectar diferencias en sus niveles de expresión, la PCR en tiempo real se ha llevado a cabo mediante dos ensayos Taqman que abarcan tanto los exones 1-2, como los exones 3-4 (Tabla 7).



**Figura 39: Efecto de SHOX sobre los niveles de expresión de *HMGA2* mediante experimentos de PCR a tiempo real. A y B:** Células U2OS. **C y D:** Células HEK293. Las células se transfectaron con el vector pHV vacío o conteniendo el ADN complementario de *SHOX*. A las 24 horas post-transfección se extrajo el ARN total de las células, y se llevó a cabo la reacción de retrotranscripción y la PCR a tiempo real. Los datos se han normalizado frente a la expresión del control endógeno GAPDH. **A y C:** Expresión de *SHOX*. **B y D:** Expresión de *HMGA2*. Los datos se han medido por duplicado, y se han realizado tres réplicas independientes de cada experimento. El asterisco representa el P valor de los ratios de expresión de cada gen estudiado con o sin la presencia de SHOX (\*\*p<0,01). SHOX activa la expresión de *HMGA2* en células U2OS y HEK293.

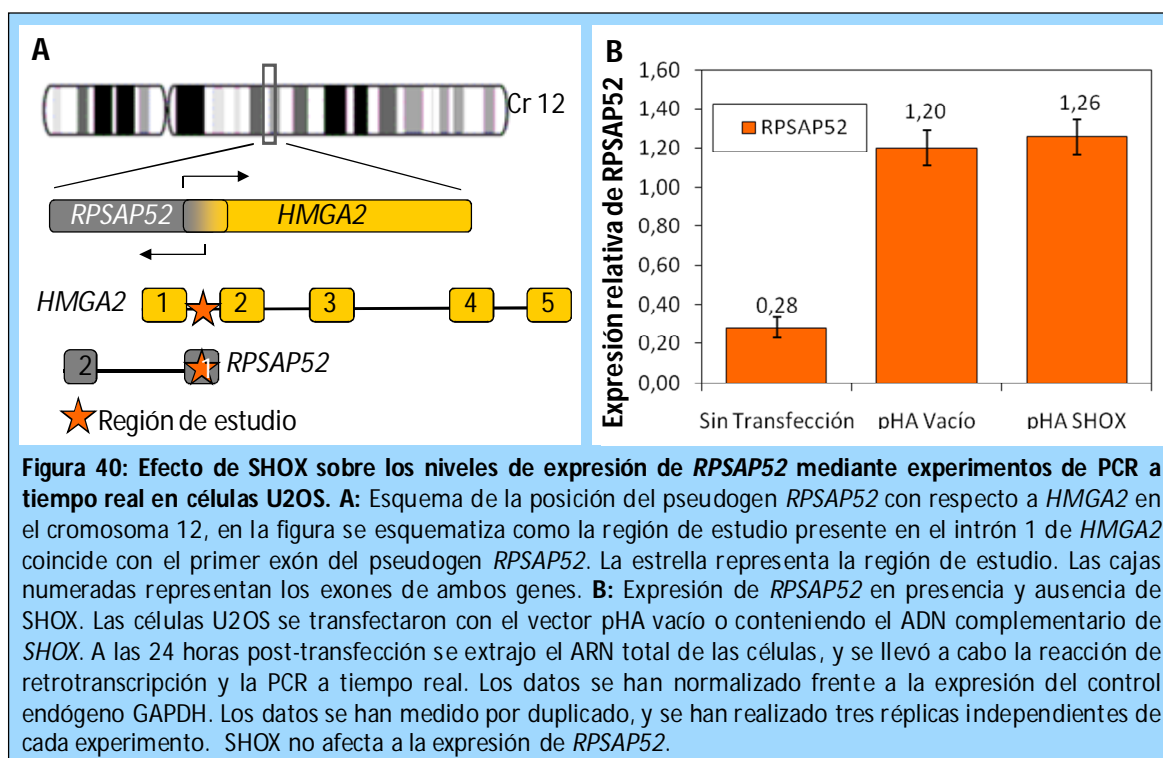
Transcrito	Pares de bases	Exones	Ensayos Taqman	
			Exones 1-2	Exones 3-4
001	4473	1-2-3-4-5	Si	Si
008	1529	1-2-3-4a	Si	No
011	8094	1-2-3-4b	Si	Si
003	1788	1-2-3-4c	Si	No
006	1444	1-2-3-4d	Si	No
005	1398	1-2-3-4e	Si	No
013	611	1-2-3-4-5a	Si	Si

**Tabla 7: Esquema de los transcritos de *HMGA2*.** En la tabla se indican los transcritos de *HMGA2* con marco de lectura abierto según ENSEMBL ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)). Se indica el número de pares de bases que los forman, y los exones contenidos en ellos, tomando como referencia el transcrito 001, que es el transcrito utilizado en los experimentos de la presente Tesis Doctoral. Las letras que acompañan a los exones 4 o 5 indican que su secuencia no es la misma que la de referencia (transcrito 001). Tan solo los transcritos 001 y 008 están descritos por el consenso CDS (CCDS). También se indica qué sondas de los ensayos Taqman correspondientes (Life Technologies) detectan cada transcrito.

Los resultados muestran que la sobreexpresión de *SHOX* activa la expresión del ARNm endógeno de *HMGA2* tanto en células U2OS (Figura 39 A y B) como en células HEK293 (Figura 39 C y D). Los valores de activación en ambos tipos celulares son similares, 1.12 veces para ambas sondas en células U2OS y 1.09 y 1.18 para las sondas que abarcan los exones 1-2 y 3-4 en células HEK293, respectivamente.

### 2.3. Efecto de *SHOX* sobre la expresión endógena de *RPSAP52*

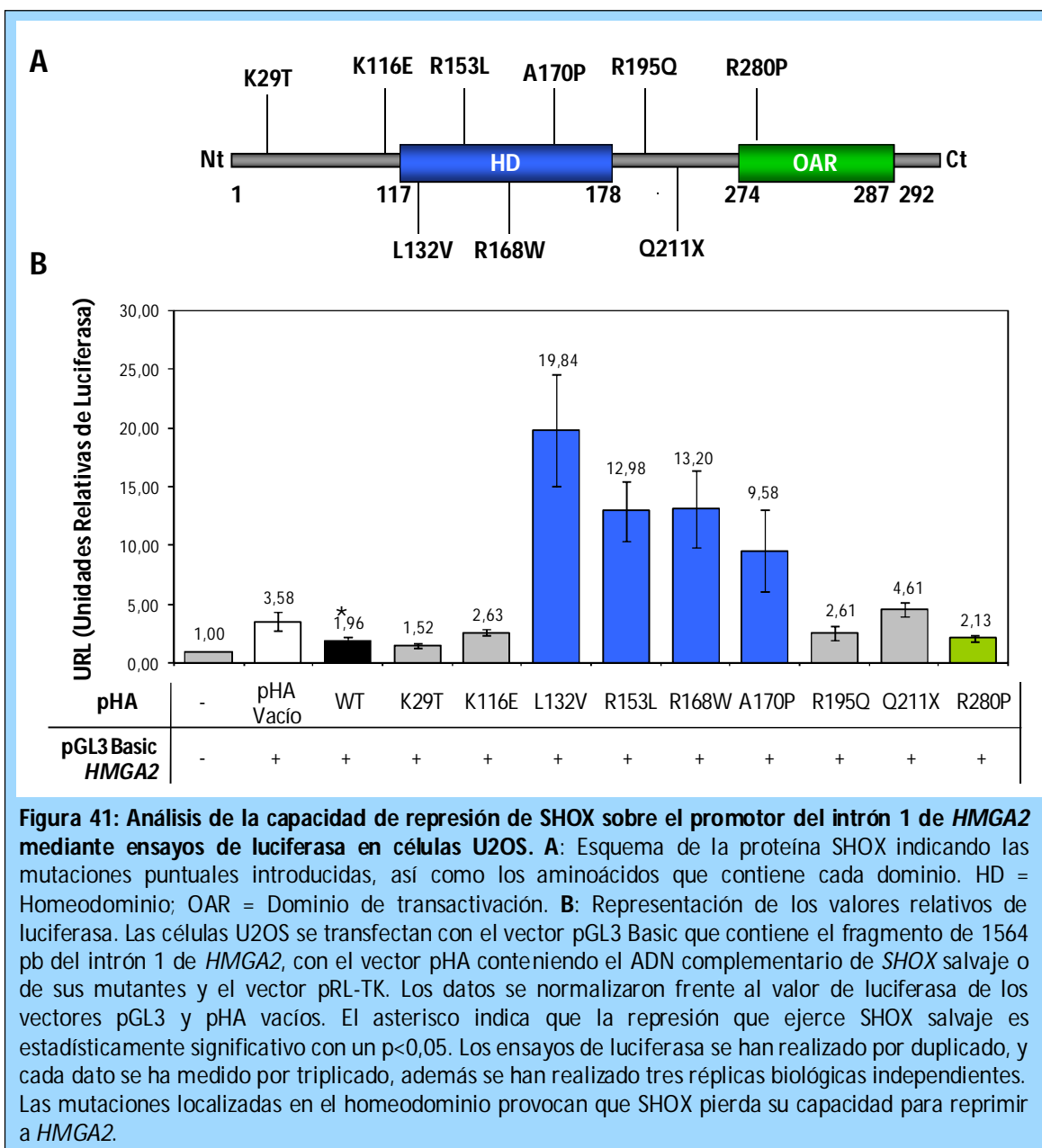
Dado que existe actividad promotora en orientación 3'-5' en el intrón 1 de *HMGA2* y que la región donde está localizado este nuevo promotor coincide exactamente con el inicio de transcripción del pseudogen *RPSAP52* (Figura 40A), nos planteamos la posibilidad de que este nuevo promotor que hemos identificado pudiera estar regulando la expresión de *RPSAP52*. Es por ello que llevamos a cabo experimentos de PCR a tiempo real para medir los niveles de ARN endógeno de *RPSAP52* en presencia y ausencia de *SHOX* en células U2OS. Los resultados muestran que *SHOX* no ejerce ningún efecto sobre la expresión de *RPSAP52* (Figura 40B).



## 2.4. Análisis del efecto de las mutaciones de SHOX sobre la regulación de *HMGA2*

Para confirmar el efecto de SHOX sobre *HMGA2* visto en los experimentos anteriores, se llevaron a cabo experimentos de luciferasa en células U2OS en los que se comparó el efecto de diferentes mutaciones de SHOX identificadas en pacientes con DLW con respecto al de SHOX salvaje sobre su capacidad reguladora del promotor de *HMGA2* (Figura 41A).

Los resultados obtenidos muestran que las mutaciones localizadas en el homeodominio provocan que SHOX pierda su capacidad de reprimir a *HMGA2*. Por otro lado, las mutaciones localizadas en el dominio de transactivación o fuera de los dominios no parecen afectar a la capacidad represora de SHOX (Figura 41B).

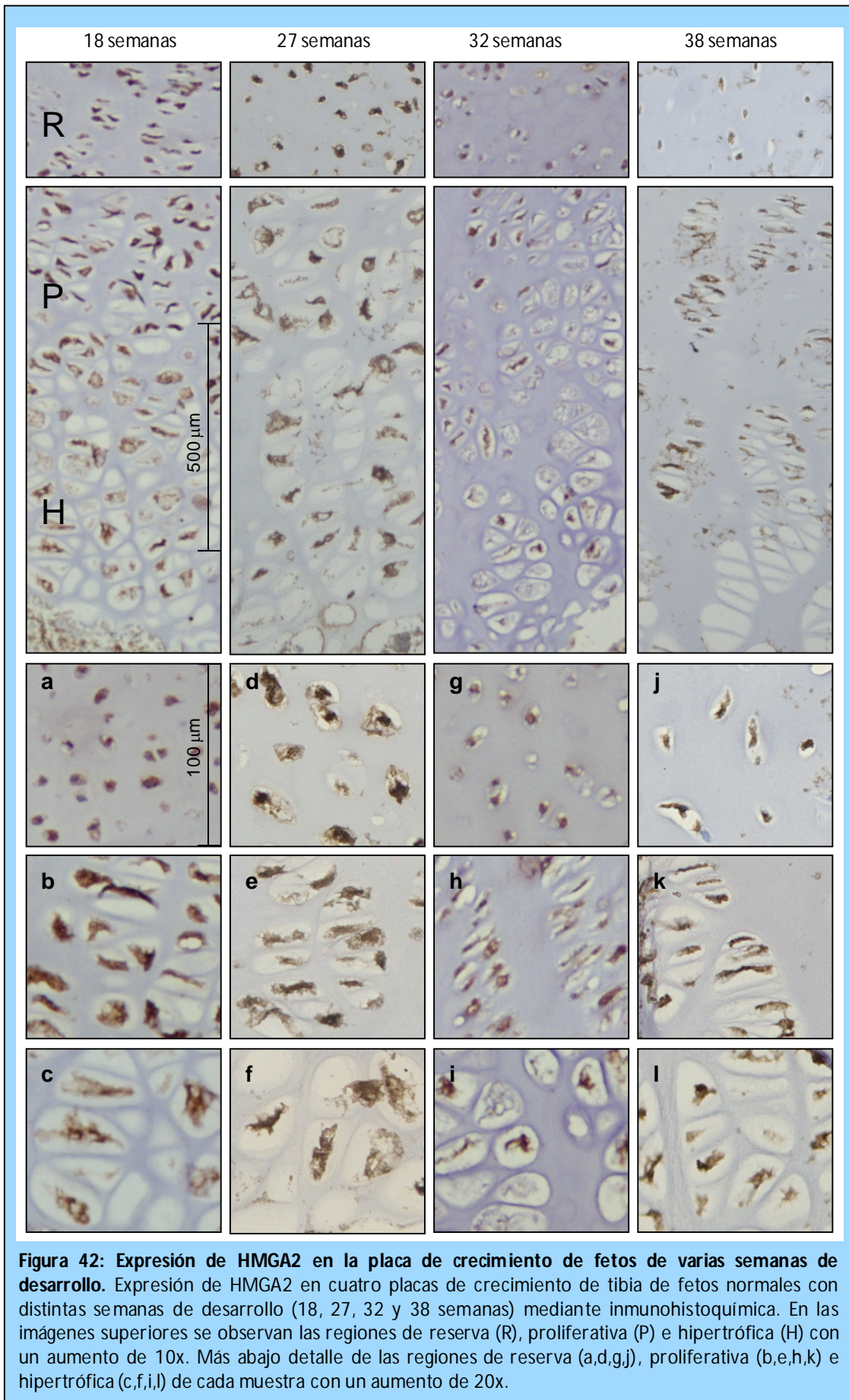


## 2.5. Coexpresión de SHOX y HMGA2 en la placa de crecimiento humana

Para poder implicar a HMGA2 en la regulación del crecimiento óseo se llevaron a cabo ensayos de inmunohistoquímica de SHOX (Figura 21) y de HMGA2 (Figura 42) en la placa de crecimiento de tibia de cuatro fetos normales, de 18, 27, 32 y 38 semanas de gestación, para así demostrar la colocalización de ambas proteínas en los condrocitos de la placa de crecimiento.

La expresión de HMGA2 se mantiene en todas las zonas de la placa de crecimiento humana a lo largo del desarrollo. Tanto en las regiones de reserva, como en la proliferativa e hipertrófica la expresión de HMGA2 es intensa y constante a lo largo del desarrollo (Figura 42).





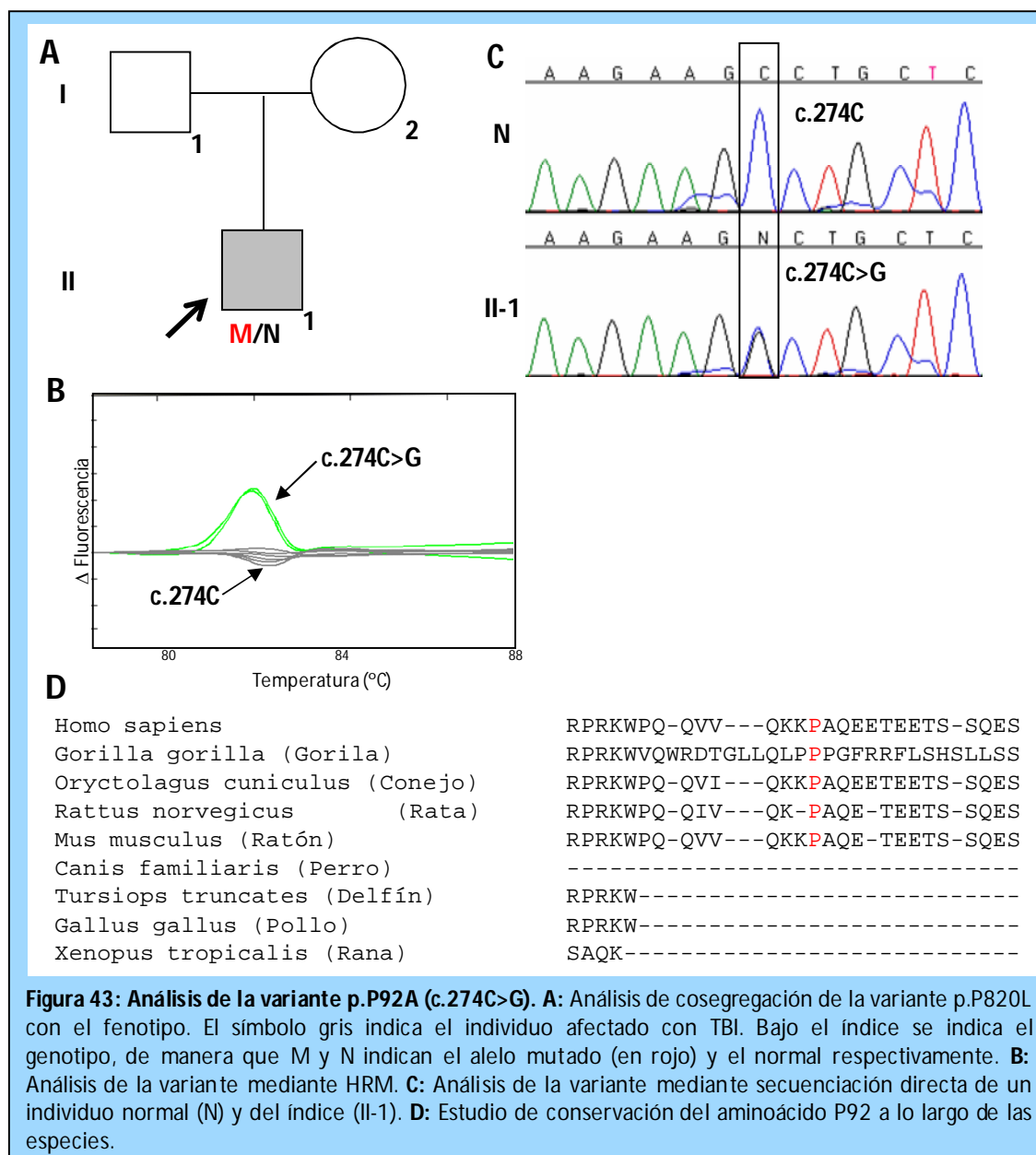
## 2.6. Rastreo de mutaciones en *HMGA2*

El rastreo de mutaciones en *HMGA2* se ha realizado en 116 pacientes con DLW y 175 pacientes con TBI sin defectos en *SHOX* o en sus *enhancers*.

### 2.6.1. Rastreo de mutaciones puntuales y pequeñas delecciones/inserciones en *HMGA2*

El rastreo de mutaciones puntuales y pequeñas delecciones o inserciones en el gen *HMGA2* se llevó a cabo mediante HRM y/o secuenciación directa.

Tan solo se ha detectado un cambio ya descrito en un paciente español diagnosticado con TBI, que consideramos que podría ser patogénico (Figura 43). El cambio c.274C>G, localizado en el



exón 4 de *HMGA2*, da lugar a la variante p.P92A, que se localiza entre el tercer dominio de unión a ADN y la cola ácida de *HMGA2*. Esta variante no está registrada en *Exome Variant Server*, pero sí ha sido descrita en 4/488 alelos de individuos africanos (0,8%) según la base de datos *1000 genomes* (rs151017786). En el grupo de individuos españoles de estatura normal este cambio fue detectado en 2 de los 350 alelos analizados (0,6%). No se ha podido realizar el análisis de cosegregación por falta de muestra de los familiares. El aminoácido P92 está poco conservado filogenéticamente (Figura 43), sin embargo, las herramientas bioinformáticas de predicción de patogenicidad utilizadas coinciden en considerar la variante p.P92A como probablemente patogénica, con una puntuación de 0,993 y 0,999 para *Polyphen* y *MutationTaster*, respectivamente.

Asimismo, durante el análisis de las secuencias de *HMGA2* se han detectado cambios intrónicos tanto descritos como no descritos, pero ninguno de ellos parece estar implicado en la alteración del patrón de *splicing* de *HMGA2*.

Variante	nº de pacientes DLW	nº de pacientes TBI	Nº identificador de SNP	Predicción de alteración de splicing
c.111+85G>C	2		ND	NO
c.111+96G>A		1	ND	NO
c.111+97C>A		1	ND	NO
c.111+138C>G	3		ND	NO
c.198+36C>T	1		rs180951147	NO
c.249+6T>A		20	rs73115423	NO
c.249+7A>T	2		ND	NO
c.250-189G>A	1	1	ND	NO
c.282+28C>T	1		ND	NO

**Tabla 8: Variantes intrónicas que se han detectado en *HMGA2*.** En la tabla se indica el nombre de cada variante y el número de pacientes con discondrosteosis de Leri-Weill (DLW) y talla baja idiopática (TBI) que la presentan. Si la variante está descrita se indica su número de identificador de SNP, también se indica la predicción de alteración de *splicing* utilizando la herramienta informática Alamut v2.0. (ND: No descrito)

### 2.6.2. Análisis de deleciones y duplicaciones en el gen *HMGA2*

Para realizar el análisis de deleciones y duplicaciones en el gen *HMGA2* se ha diseñado y puesto a punto un ensayo de MLPA. Las sondas diseñadas incluyen tanto sondas complementarias a las secuencias exónicas como a secuencias localizadas en los flancos 5' y 3' del gen y en regiones control que se encuentran en cromosomas diferentes al 12.

No se ha identificado ninguna deleción o duplicación en *HMGA2* en las cohortes de pacientes analizadas.



## DISCUSIÓN



Mediante los experimentos previos de Chip on Chip se observó que SHOX interacciona con un gran número de regiones del genoma, incluyendo un total de 347 de genes conocidos. Entre todas las regiones genómicas de unión de SHOX reveladas por el ensayo Chip on Chip, se seleccionaron dos relacionadas con vías de señalización potencialmente implicadas en la regulación del crecimiento esquelético: el intrón 3 del gen *ADAMTSL3* y el intrón 1 de *HMGA2* como posibles dianas de regulación transcripcional. La colocación de *ADAMTSL3* y *HMGA2* con SHOX en los condrocitos de la placa de crecimiento humana ha sido fundamental para poder implicar a estas proteínas en la ruta de señalización de SHOX durante la regulación del crecimiento óseo.

## 1. *ADAMTSL3*

### 1.1. Confirmación y caracterización de *ADAMTSL3* como diana de transcripción de SHOX

En el estudio de *ADAMTSL3* como posible diana de transcripción de SHOX se analizó un fragmento amplio de 1542 pb localizado en el intrón 3 de dicho gen mediante ensayos de luciferasa en células de osteosarcoma humano (U2OS). Los resultados mostraron que existe un elemento *enhancer* dentro de esta región, ya que tan solo se detecta actividad cuando se utiliza el vector pGL3 Promotor. Este *enhancer* es bidireccional, ya que conserva su actividad en ambas orientaciones. Además, este nuevo *enhancer* es reprimido por SHOX de manera bidireccional, aunque de forma más eficiente en orientación 5'-3'. Asimismo, hemos demostrado mediante experimentos de RT-PCR, que SHOX es capaz de reprimir la expresión endógena de *ADAMTSL3* unas 3.4 veces en células U2OS, revalidando, en una escala más biológica, lo observado en los experimentos de luciferasa.

El conjunto de estos resultados confirmaron lo observado en los experimentos previos de Chip on Chip, en los que se observó inmunoprecipitación de cromatina con el anticuerpo contra la histona H3K27Me3, que se une específicamente a regiones que están siendo reprimidas.

También hemos demostrado que el *enhancer* es dependiente del tipo celular en el que se encuentra, de forma que es funcional en las líneas celulares mesenquimales (C3H/10T1/2) y de osteosarcoma (U2OS), pero no lo es en células embrionarias de riñón (HEK293). Estos datos indican que la regulación que ejerce SHOX sobre *ADAMTSL3* tiene lugar desde la fase de células mesenquimales, que intervienen en los primeros pasos de la formación de los huesos largos, hasta la formación de células de osteosarcoma, que a pesar de ser tumorales, derivan de los osteoblastos, un tipo celular presente en los huesos. Estas diferencias según el tipo celular

podrían deberse a que SHOX necesita otros cofactores para poder llevar a cabo su función de regulación. Estos cofactores podrían ser específicos tanto del tipo celular como del momento del desarrollo.

Asimismo, recientemente nuestro grupo demostró que SHOX coopera con los cofactores SOX5, SOX6 y SOX9, también conocidos como trío de SOX, para activar el *enhancer* del agrecano, de manera que SHOX por sí solo, no es capaz de activar dicho *enhancer* (Aza-Carmona et al, 2011). En nuestro caso es necesario destacar que la acción del trío de SOX en la regulación del *enhancer* de *ADAMTSL3* es muy diferente a lo descrito anteriormente, ya que nuestros experimentos demuestran que, si bien tanto SHOX como los cofactores SOX5, SOX6 y SOX9 por separado, tienen capacidad para reprimir el *enhancer* de *ADAMTSL3* cuando cada uno de estos cofactores está en presencia de SHOX, la represión se intensifica, mostrando un efecto aditivo o sinérgico. Asimismo, cuando se expresa el trío completo, el efecto de represión no se ve incrementado. Estos resultados indican que SHOX es capaz de regular la expresión de sus dianas de transcripción mediante distintos mecanismos.

La delimitación del elemento *enhancer* presente en el intrón 3 de *ADAMTSL3* mostró que existe un único *enhancer* que abarca una longitud mínima de 198 pb localizado precisamente en la región genómica de unión de SHOX revelada en el experimento de ChIP on Chip. Este elemento no se ha podido delimitar más, ya que en el momento en el que se fraccionaba dicho fragmento el efecto del *enhancer* se perdía.

Dentro de este fragmento se han identificado distintas secuencias que podrían ser el sitio de unión de SHOX. A pesar de que se describió que SHOX se une a secuencias palindrómicas perfectas del tipo TAAT(N)nATTA, siendo preferentemente n=3, es decir, secuencias P3 (Rao et al, 2001), en los últimos años, en los que se han descrito tres nuevas dianas de transcripción de SHOX, no se ha podido identificar en ellas ninguna secuencia palindrómica perfecta de ese tipo, como la región de unión de SHOX. De hecho, se ha propuesto que SHOX se puede unir a secuencias palindrómicas imperfectas (Marchini et al, 2007) o simplemente, a secuencias ricas en AT (Decker et al, 2011). Dentro de la región delimitada de 198 pb existen dos secuencias P3 imperfectas y varias regiones ricas en AT que podrían ejercer como lugar de unión de SHOX. Para tratar de identificar la secuencia de unión de SHOX, se llevarán a cabo ensayos de retardo en gel (EMSA o *Electrophoretic Mobility Shift Assay*), en los que se mutagenizarán las secuencias candidatas, para determinar cual de ellas interviene directamente en la unión.

El estudio de la capacidad de represión de las formas mutantes de SHOX mostró que el dominio de SHOX responsable de su capacidad represora, es el homeodominio. De las nueve mutaciones estudiadas, solamente tres de las cuatro localizadas en el homeodominio de SHOX



(p.L132V, p.R168W, p.A170P) anularon su capacidad para reprimir a *ADAMTSL3*. El homeodominio de los factores de transcripción es responsable de distintas funciones, como la localización nuclear (Sabherwal et al, 2004a), la unión al ADN (Decker et al, 2011; Marchini et al, 2007) y las interacciones con otras proteínas (Aza-Carmona et al, 2011). Los tres aminoácidos del homeodominio, cuya mutación altera la capacidad represora de SHOX sobre el *enhancer* de *ADAMTSL3*, corresponden a residuos conservados al 100% en el homeodominio de las proteínas que pertenecen a la clase paired-related (Banerjee-Basu and Baxevanis, 2001). Se ha descrito que las mutaciones en estos residuos impiden la formación de homodímeros de SHOX e interfieren gravemente en su capacidad para unirse al ADN (Schneider et al, 2005). Además, en el caso de p.A170P, la mutación impide la localización nuclear (Sabherwal et al, 2004).

La mutación p.R153L, sin embargo representa una excepción. Si bien el residuo R153 no está especialmente conservado a lo largo de la evolución, la substitución del mismo por leucina, se ha identificado en múltiples familias que presentan DML, DLW o TBI (Grigelioniene et al, 2000; Niesler et al, 2002; Zinn et al, 2002; Falcinelli et al, 2002; Stuppia et al, 2003). Este mutante de SHOX conserva, más o menos, sus capacidades de localización nuclear, unión a ADN y dimerización, pero no es capaz de actuar como un activador transcripcional (Schneider et al, 2005). Esta mutación tampoco afecta la capacidad represora de SHOX sobre el *enhancer* de *ADAMTSL3*, posiblemente porque no afecta al mecanismo mediante el que SHOX reprime. Es decir, mientras que la capacidad de SHOX para activar reside en su dominio OAR, puede ser que su capacidad represora simplemente resida en su capacidad de unión al ADN mediante el homeodominio. Esta hipótesis está apoyada por la no influencia de las mutaciones p.R280P y p.Q211X en la capacidad de SHOX para reprimir a *ADAMTSL3*. La mutación p.R280P se sitúan en el OAR, mientras que p.Q211X simula a la isoforma SHOXb que carece del OAR. Por último, y tal y como esperábamos, las mutaciones localizadas fuera de los dominios de SHOX, como p.K29T y p.K116E, y la mutación p.R195Q, localizada entre dominios, tampoco afectan a la capacidad de SHOX para reprimir a *ADAMTSL3*.

## **1.2. Implicación e importancia de la familia de proteínas ADAMTS(L) en el crecimiento óseo**

Aunque actualmente la función de *ADAMTSL3* es desconocida, sabemos que *ADAMTSL3* y *ADAMTS10* (*A Disintegrin-like And Metalloproteinase with ThromboSpondin type 1 motif 10*, MIM#608990) interaccionan entre sí (Sengle et al, 2012). En este trabajo también se mostró, mediante resonancia plasmática superficial (SPR), que el extremo C-terminal de *ADAMTSL3* es capaz de unirse a *ADAMTS10*, pero también demostraron que este mismo fragmento de

ADAMTSL3 es capaz de unirse a la región N-terminal de la fibrilina-1 y al dominio C-terminal de LTBP-1 (*Large latent TGF- $\beta$  latent Protein-1*; MIM#150390), proteínas que forman parte de la matriz extracelular (MEC) (Sengle et al, 2012).

Mediante experimentos de inmunoprecipitación hemos confirmado la interacción entre ADAMTSL3 y ADAMTS10, pero además hemos mostrado que los dominios TSR2-5 de ADAMTSL3 son los responsables de dicha unión, a diferencia de lo publicado por Sengle y col. en 2012, quienes postularon que es el extremo C-terminal de ADAMTSL3, que contiene el dominio espaciador con los tres dominios de tipo Ig, los dominios TSR10-13 y el dominio PLAC, el responsable de la unión con ADAMTS10. Los dominios TSR (*Thrombospondin type I repeats*) se describieron por primera vez en la proteína trombospondina-1 (TSP-1, MIM#188060) (Lawler and Hynes, 1986) y desde entonces, se han descrito 41 proteínas en humanos que contienen dominios TSR (Venter et al, 2001) y que influyen en el desarrollo óseo y en su remodelación (Hankenson et al, 2010). La importancia de estos dominios se debe a su capacidad de interactuar con otras proteínas de la MEC, como la metaloproteínasa 2 de la matriz (MMP2, MIM#120360), que participa en la degradación de la matriz cartilaginosa y la apoptosis de los condrocitos hipertróficos. Por otro lado, los dominios de tipo inmunoglobulina también podrían estar implicados en esta interacción, ya que se ha descrito que juegan un importante papel en interacciones entre proteínas (Berisio et al, 2012). Un futuro ensayo de inmunoprecipitación con nuevos fragmentos de ADAMTSL3 aclarará cuál o cuáles son las regiones de ADAMTSL3 responsables de la unión a ADAMTS10.

En relación con ADAMTS10, se conoce que es una proteasa que se encuentra en la matriz extracelular y que está expresada en un gran número de tejidos, entre ellos, en condrocitos (Dagoneau et al, 2004). Alteraciones en el gen *ADAMTS10* o en el gen de la fibrilina-1 (*FBN1*, MIM#134797) dan lugar al síndrome de Weill-Marchesani (MIM#608328; MIM#277600; Dagoneau et al, 2004; Kutz et al, 2008; Faivre et al, 2003), donde el tejido conectivo está alterado y da lugar, entre otras características fenotípicas, a talla baja (Tabla 6). La participación de ADAMTS10 y FBN1 en el mismo trastorno sugiere que ambas proteínas están implicadas en una ruta común, de hecho, se ha demostrado recientemente que estas proteínas interactúan entre sí y que ADAMTS10 acelera el ensamblaje de la fibrilina-1 (Kutz et al, 2011).

La fibrilina-1 es el componente mayoritario de las microfibrillas, que son un conocido regulador de la biodisponibilidad de TGF- $\beta$  en la matriz extracelular (Kutz et al, 2011). La ruta de señalización de TGF- $\beta$  está implicada en diferentes procesos celulares, como el arresto del ciclo celular, diferenciación y homeostasis (Le Goff and Cormier-Daire, 2012). En la MEC, TGF- $\beta$  se encuentra asociado a distintos complejos proteicos. Una de las principales familias de proteínas a

las que se une son las LTBP, a través de las cuales es capaz de unirse a las microfibrillas, ya que TGF- $\beta$  por sí mismo no es capaz de unirse a la fibrilina-1 (Isogai et al, 2003). Para que la cascada de señalización comience, TGF- $\beta$  ha de estar libre en la MEC, para lo que requiere que sea liberado de los complejos proteicos que forma. Una vez TGF- $\beta$  es liberado en la MEC y se une a sus receptores de membrana (TGFBR), comienza la cascada de señalización, en la que TGF- $\beta$  induce la fosforilación, y por lo tanto la activación, de las proteínas SMAD2 y SMAD3, que forman complejos con el mediador SMAD4 para traslocarse al núcleo y activar la expresión de los genes dependientes de esta ruta (Le Goff and Cormier-Daire, 2012).

Hay otros miembros de la familia de proteínas ADAMTS(L), además de ADAMTS10, que están relacionado con la fibrilina-1 y TGF- $\beta$ . Se conoce que ADAMTSL6 se une a la fibrilina-1 y potencia la formación de las microfibrillas (Tsutsui et al, 2010), también se ha demostrado la colocalización de ADAMTSL4 con las microfibrillas (Gabriel et al, 2012) y se ha visto que ADAMTSL2 es capaz de unirse tanto a LTBP1 como a la fibrilina-1 (Le Goff et al, 2011).

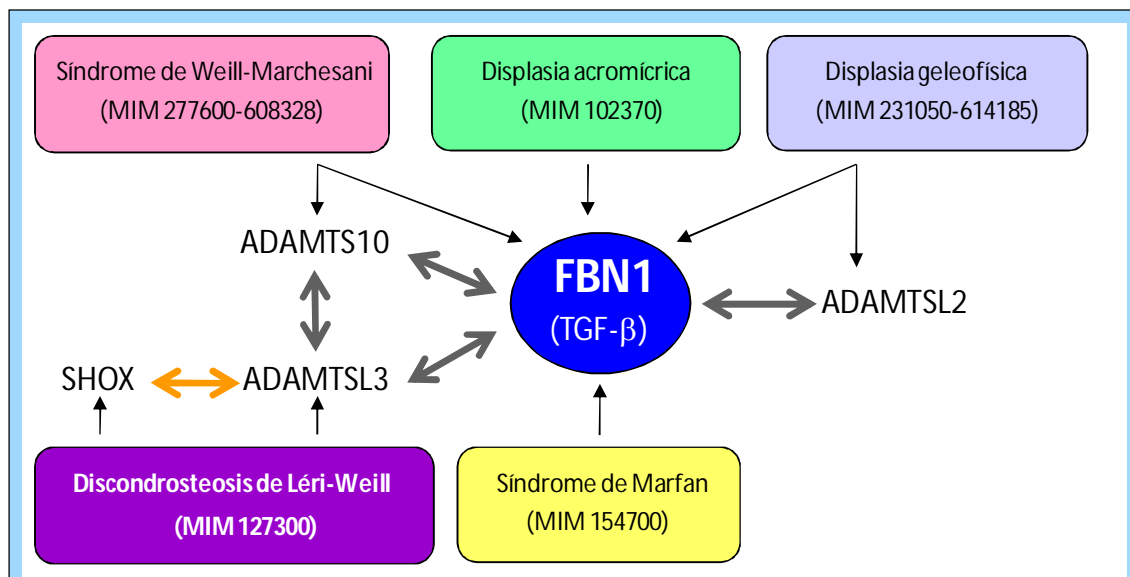
Síndrome	MIM	Gen	Características	Referencia
Weill-Marchesani (AR)	277600	<i>ADAMTS10</i>	Talla baja, braquidactilia, rigidez en las articulaciones, y anomalías características de los ojos incluyendo ectopía de la lente, miopía severa y glaucoma.	Dagoneau et al, 2004
Weill-Marchesani (AD)	608328	<i>FBN1</i>		Faivre et al, 2003
Marfan (AD)	154700	<i>FBN1</i>	Longitud excesiva de las extremidades, aracnodactilia, hiper movilidad articular, deformaciones escolióticas; dilatación progresiva de la aorta e insuficiencia mitral; ectopía de la lente.	Hayward et al, 1992
Displasia geleofísica (AR)	231050	<i>ADAMTSL2</i>	Talla baja severa, manos y pies cortos, rigidez en las articulaciones y un aspecto facial característico descrito como "feliz".	Le Goff et al, 2008
Displasia geleofísica (AD)	614185	<i>FBN1</i>		Le Goff et al, 2011
Displasia acromicrica (AD)	102370	<i>FBN1</i>	Talla baja, manos y pies cortos, dismorfismo facial leve y anomalías radiológicas características de las manos.	Le Goff et al, 2011

**Tabla 6: Resumen de las patologías causadas por defectos en genes de la familia ADAMTS(L) o FBN1.** En la tabla se indica el nombre del síndrome y su forma de herencia (AR: Autosómico Recesivo; AD: Autosómico Dominante), su número MIM, el gen afectado, las características propias de dichos síndromes y la referencia bibliográfica correspondiente.

Con respecto a las patologías asociadas a la FBN1, la mayoría de las mutaciones descritas en el gen *FBN1* causan el síndrome de Marfan (MIM#154700; Ramirez et al, 2007), un trastorno que afecta al tejido conectivo generando, entre otras características, un aumento de la longitud de los miembros. Además del síndrome de Marfan, mutaciones en *FBN1* dan lugar a la displasia geleofísica (MIM#231050; Le Goff et al, 2011), que cursa entre otras características con talla baja.

La displasia geleofísica también está causada por mutaciones en *ADAMTSL2*, y se ha visto que la patogenicidad de estas mutaciones radica en que son capaces de alterar los niveles de TGF- $\beta$  (Le Goff et al, 2008). Mutaciones en *FBN1* también causan la displasia acrométrica (MIM#102370; Le Goff et al, 2011) caracterizada por dismorfologías radiológicas entre otras características (Tabla 6).

El conjunto de estos datos muestra el fuerte vínculo que existe entre la ruta de señalización de TGF- $\beta$ , la familia de proteínas ADAMTS(L) y el control del crecimiento óseo. Estos datos, junto con la conexión, puesta de relieve por nuestros experimentos, entre *SHOX* y *ADAMTSL3*, evidencian por primera vez, que existe una relación entre *SHOX* y la ruta de señalización de TGF- $\beta$  (Figura 44).



**Figura 44: Implicación de la familia de proteínas ADAMTS(L) en la ruta de señalización de TGF- $\beta$ .** Los cuadros coloreados indican las patologías asociadas a defectos en el crecimiento. Las flechas negras conectan cada patología con el gen que las causa. Las flechas grises indican las interacciones entre proteínas. La flecha naranja indica que *SHOX* interacciona con el gen *ADAMTSL3*, i.e. es una diana de transcripción.

### 1.3. Rastreo de mutaciones y delecciones/duplicaciones en *ADAMTSL3*

La hipótesis anterior sugiere que los defectos en *SHOX* que dan lugar a las distintas displasias óseas, podrían explicarse por alteraciones en la ruta de señalización de TGF- $\beta$  en el hueso, y que alteraciones en *ADAMTSL3* podrían explicar algunos de los casos en los que los pacientes presentan DLW o TBI pero no tienen defectos ni en *SHOX* ni en sus *enhancers*. Es por ello que hemos realizado un rastreo de mutaciones en el gen *ADAMTSL3* en pacientes con DLW (n=116) o TBI (n=175) sin defectos en *SHOX* o sus *enhancers*. Este análisis dio como resultado la identificación de 11 nuevas variantes en la secuencia codificante de *ADAMTSL3*, no descritas en

ese momento, cinco en pacientes con DLW y seis en pacientes con TBI, cuya implicación como base molecular de la DLW y talla baja observadas deberá ser demostrada mediante ensayos funcionales específicos. De las cinco variantes detectadas en pacientes con DLW, tres de ellas representan sólidos candidatos: p.R1506Q, p.M1136V, p.C814Y, por varias razones. La variante p.R1506Q, por su ausencia en población de estatura normal y su alto grado de conservación a lo largo de la evolución. Igualmente, la variante p.M1136V no ha sido detectada en población normal, si bien su bajo grado de conservación filogenética nos hace tener cierta cautela ante su posible patogenicidad. Con respecto a p.C814Y, también se considera como posiblemente patogénica, aunque con más prudencia que las anteriores, ya que si bien está muy conservada a lo largo de la evolución está presente en población española de estatura normal ( $-2DE < \text{talla} < +2DE$ ) con una frecuencia alélica de 5/350 (1,4%) y del 0,03% en población europeo-americana, según EVS.

Por otro lado, con respecto a la variante p.K242E, parece tratarse de un polimorfismo propio de población afro-caribeña, pero al ser un aminoácido filogenéticamente tan conservado, y no poder conocer la estatura ni el fenotipo de los individuos control en los que se ha detectado dicha variante, consideramos que no podemos descartarlo como posible variante patogénica. Por último, la variante p.R981W se ha descartado como patogénica por no cosegregar con el fenotipo de DLW en la familia en estudio. De hecho, al poco tiempo de encontrar esta variante se describió en EVS, si bien en una frecuencia alélica baja, muy similar a la de nuestra cohorte de pacientes (0,3%).

Con respecto a las variantes identificadas en pacientes con TBI, p.V432A, p.P820L y p.R1009W presentan fuertes indicios de patogenicidad por no estar presentes en población española de estatura normal ni en los registros de población general en EVS. Además, en los tres casos se trata de aminoácidos altamente conservados a lo largo de la evolución. Por otro lado, las variantes p.L672S y p.T1509M, también son buenos candidatas, aunque con cierta cautela, ya que si bien no están presentes en población española de estatura normal ni en población general en EVS, su grado de conservación filogenética es bajo.

En todos los casos de variantes identificadas en pacientes con TBI el análisis de cosegregación familiar nos aporta poca información, ya que en la mayoría de los casos ambos padres tienen una estatura por debajo de lo normal y no existen otras características clínicas con las que determinar dicha cosegregación.

Con respecto a la variante sinónima p.T567T, es un caso especial encontrado en un paciente con TBI, la misma, no está presente en población general, según EVS, ni tampoco en el grupo de controles españoles con estatura normal. *A priori* este cambio se podría considerar como benigno,

de hecho, hemos descartado su implicación en el proceso de *splicing* a través de varias herramientas informáticas de predicción de *splicing* (Alamut v2.0), pero en los últimos años se ha demostrado que los cambios sinónimos pueden ser patogénicos por medio de distintos mecanismos, además de los cambios en el patrón de *splicing* ya descartados (Sauna and Kimchi-Sarfaty, 2011; Chamary et al, 2006). El nuevo codón generado podría requerir el uso de un ARN de transferencia poco común, y así ralentizar la velocidad con la que la proteína se traduce, lo que puede generar defectos en el plegado de la proteína y por lo tanto disminuir la cantidad de proteína funcional en la célula (Kimchi-Sarfaty et al, 2007). También, el cambio de nucleótido puede modificar la estructura secundaria del ARN mensajero y por tanto la velocidad de traducción, lo que también puede derivar en alterar la cantidad de proteína funcional disponible (Nackley et al, 2006). Estas opciones y el hecho de que este cambio no esté presente en población general, nos hace considerar esta variante sinónima como posiblemente patogénica. El futuro análisis de cosegregación en la familia podría ayudarnos a determinar su posible patogenidad.

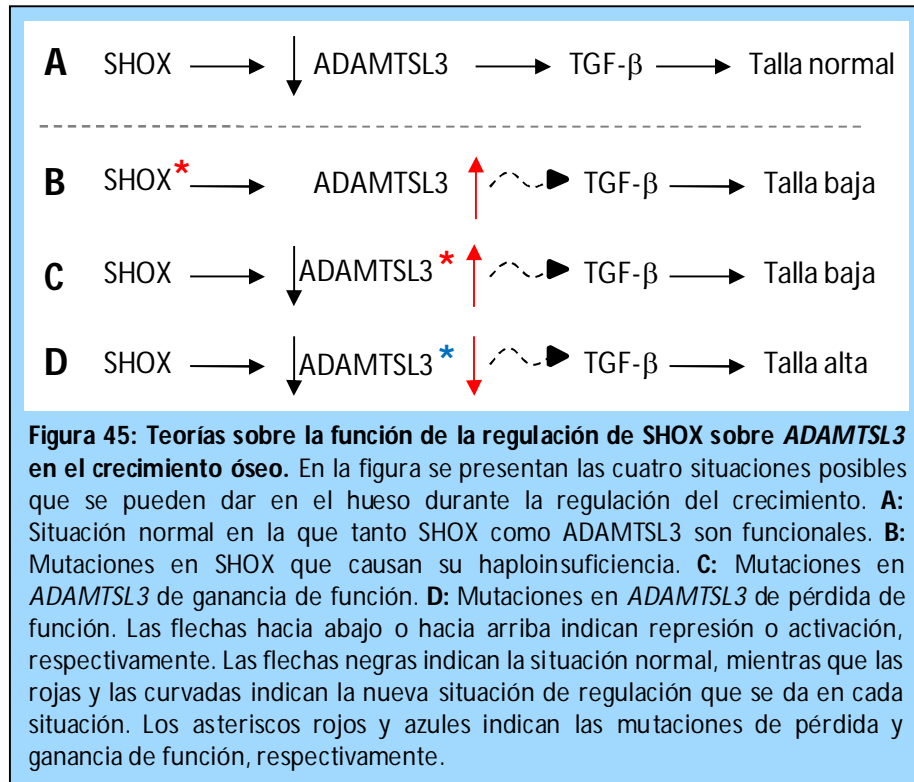
Además, hemos analizado en estas cohortes de pacientes la presencia de deleciones y duplicaciones mediante un ensayo de MLPA (*Multiple Ligation Probe Amplification*) de diseño propio. No hemos detectado ninguna alteración en el número de copias de *ADAMTSL3*. Al tratarse de un ensayo de diseño propio, el número de sondas está limitado, por lo que tan solo hemos podido colocar ocho sondas exónicas distribuidas a lo largo de la longitud del gen, aun conteniendo un total de 30 exones. Pero, al ser un gen tan polimórfico, y tener SNPs en heterocigosis en prácticamente todos los exones, hemos podido descartar la presencia de deleciones en los 22 exones restantes simplemente por secuenciación.

En resumen, hemos identificado 11 variantes en la secuencia codificante de *ADAMTSL3* que podrían ser patogénicas. La puesta a punto y desarrollo de un ensayo funcional son imprescindibles para poder analizar y, en su caso, confirmar la verdadera patogenidad de estas variantes. Además, dado que hemos detectado un número considerable de nuevas variantes potencialmente patogénicas, se continuará la búsqueda de nuevas mutaciones en *ADAMTSL3* en una cohorte mayor de pacientes que presentan DLW o TBI.

#### **1.4. Teorías sobre la función fisiológica de SHOX y ADAMTSL3 en el crecimiento óseo**

El descubrimiento de la regulación que ejerce SHOX sobre *ADAMTSL3* y, a su vez, la relación que existe entre *ADAMTSL3* y el eje de regulación de TGF- $\beta$ , da pie a teorizar sobre las implicaciones de estas interacciones en el hueso durante el desarrollo.

En una situación normal, SHOX está reprimiendo la expresión de *ADAMTSL3*, dando lugar a unos niveles de expresión normales mediante los que interaccionará de forma ordinaria con *ADAMTS10*, fibrilina-1 y otras posibles proteínas de la MEC para mantener los niveles de TGF- $\beta$  habituales en el hueso, dando lugar a un crecimiento sin anomalías (Figura 45A). Cuando existe haploinsuficiencia de SHOX, como ocurre en pacientes con DLW, la represión sobre *ADAMTSL3* será menor, lo que dará lugar a su sobreexpresión causando posibles alteraciones en sus interacciones con otras proteínas, alterando los niveles de TGF- $\beta$  en el hueso y dando lugar a los defectos esqueléticos observados en la DLW (Figura 45B). La tercera situación posible es que exista una mutación en *ADAMTSL3*, lo que alteraría sus interacciones habituales con otras proteínas de la MEC, haciendo que los niveles de TGF- $\beta$  en el hueso varíen y dando lugar a un crecimiento con anomalías (Figura 45C). Especulando sobre esta hipótesis, deberíamos postular que los cambios potencialmente patogénicos que hemos encontrado en *ADAMTSL3* habrían de aportar a la proteína una ganancia de función, para que el efecto de la haploinsuficiencia de SHOX y el de las mutaciones de *ADAMTSL3*, resulten en fenotipos similares por mecanismos distintos. Es decir, en esta hipótesis los niveles de *ADAMTSL3* funcional serían más altos de lo que deberían debido a las mutaciones de postulada ganancia de función. En línea con este modelo teórico podríamos también hipotetizar una cuarta situación posible, en la que las mutaciones de pérdida de función o truncamientos de *ADAMTSL3* podrían encontrarse en individuos con una talla por encima de la esperada (Figura 45D). Esta situación se da en otras proteínas implicadas en crecimiento óseo, como *FGFR3*, en la que mutaciones de ganancia de función dan lugar, entre otras displasias esqueléticas, a la acondroplasia, un tipo de enanismo. Mientras que mutaciones de pérdida de función, como se ha visto en ratones, dan lugar a un incremento en su longitud ósea (Deng et al, 1996; Colvin et al, 1996) y en humanos, al síndrome CATSHL, que emula el fenotipo del ratón KO, ya que cursa con talla alta, entre otras características (Toydemir et al, 2006).



Como se ha indicado anteriormente, el diseño de un estudio funcional y la comprensión de la función de ADAMTSL3 en el crecimiento, son esenciales para poder determinar la patogenicidad de las variantes que hemos encontrado en el gen *ADAMTSL3*.



## 2.HMGA2

### 2.1. Confirmación y caracterización de *HMGA2* como diana de transcripción de SHOX

Con el objetivo de confirmar que *HMGA2* es una diana de transcripción de SHOX, y de caracterizar esta interacción, se llevaron a cabo ensayos de luciferasa en células U2OS. La unanimidad de los resultados con los vectores pGL3 Basic y Enhancer, mostraron que el intrón 1 de *HMGA2* contiene un promotor, y que SHOX ejerce un efecto de represión y activación cuando el amplio fragmento de estudio está clonado en orientación 3'-5' y 5'-3', respectivamente. Estos resultados revalidan lo observado en las inmunoprecipitaciones de cromatina que se llevaron a cabo para esta región con los anticuerpos contra las histonas H3K4Me3 y H3ac, que se unen a secuencias promotoras. Este nuevo promotor presente en *HMGA2* es funcional en todos los tipos celulares estudiados, al igual que el efecto de represión ejercido por SHOX, sin embargo, el efecto de activación tan solo se da en la línea celular U2OS. Las diferencias en el efecto que ejerce SHOX sobre este nuevo promotor podrían explicarse porque SHOX necesita otros cofactores para llevar a cabo su función como regulador de la actividad transcripcional, de forma que la línea celular U2OS podría contener cofactores específicos necesarios para que se de el efecto de activación del promotor en orientación 3'-5' (Mann et al, 2009).

Los resultados de la delimitación del promotor presente en el amplio fragmento de 1564 pb del intrón 1 de *HMGA2* nos permitieron acotar su presencia a un fragmento mínimo de 127 pb (1374-1501) en orientación 5'-3'. En la orientación opuesta hemos delimitado el fragmento mínimo todavía más, a tan solo 75 pb (1448-1374), que están contenidas en el fragmento anterior. En el fragmento de 127 pb existen tanto secuencias palindrómicas imperfectas, como regiones ricas en AT, ambas consideradas como buenas candidatas para la unión de SHOX (Rao et al, 2001; Marchini et al, 2007; Decker et al, 2011). Los datos de los experimentos realizados para delimitar la secuencia con capacidad promotora nos indican la presencia de un solo promotor con actividad bidireccional o de dos promotores independientes, cuyo efecto global es que la actividad promotora se de en ambas direcciones. Las dos opciones son posibles, ya que en el caso de genes enfrentados entre sí, se han descrito tanto promotores bidireccionales, que en tan solo 30 pb regulan la transcripción de ambos genes (Trinklein et al, 2004), como promotores independientes, que regulan a cada uno de los genes de manera individual, pero que comparten parte de su secuencia reguladora (Schmidt et al, 1993). El estudio de un nuevo fragmento que abarque los nucleótidos 1449-1501 en ambas orientaciones nos permitirá comprobar si existen uno o dos promotores en esta región, de manera que si este nuevo fragmento presentara

actividad promotora en orientación 5'-3', habríamos delimitado dos promotores independientes, uno contenido en el fragmento que abarca los nucleótidos 1449-1501, y otro en el fragmento de 75 pb que abarca los nucleótidos 1448-1374.

Por otro lado, el hecho de que el efecto de activación de SHOX sobre el fragmento completo de 1564 pb de *HMGA2* en orientación 3'-5' detectado en células U2OS no se haya visto reflejado en ninguno de los fragmentos estudiados, sugiere que la región de estudio podría contener una compleja combinación de activadores y represores, ya que tiene un tamaño apto para ello (Rudolph et al, 1997). En nuestro caso, hemos continuado el estudio con el promotor localizado en los 127 pb por ser el único elemento presente en la región que dio positivo en el estudio de ChIP on Chip. Para comprobar la existencia de otros reguladores, se realizarán experimentos de luciferasa en los que se estudiarán nuevos fragmentos de la región inicial en orientación 3'-5'.

Los experimentos de luciferasa llevados a cabo con las formas mutantes de SHOX, confirmaron que SHOX ejerce un efecto sobre el intrón 1 de *HMGA2*. De las nueve mutaciones estudiadas, las presentes en el homeodominio (p.L132V, p.R153L, p.R168W y p.A170P) anulan el efecto de represión de SHOX. Está descrito, que estas mutaciones en el homeodominio de SHOX impiden su homodimerización y por tanto su capacidad de unión al ADN, por lo que estos mutantes de SHOX no podrían activar ni reprimir los genes que regula. A diferencia de lo observado en la regulación de SHOX sobre *ADAMTSL3*, en el caso de *HMGA2*, la mutación p.R153L también anula la capacidad de represión de SHOX, lo que nos indica que el mecanismo mediante el cual SHOX regula a *HMGA2* es diferente al de *ADAMTSL3*. Por otro lado, ninguna de las dos mutaciones presentes en el OAR (p.R280P y p.Q211X) ni las situadas fuera de los dominios (p.K29T, p.K116E y p.R195Q), afectan a la capacidad de represión de SHOX, por lo que parece que el OAR no es necesario para que SHOX actúe sobre *HMGA2*.

Los experimentos de RT-PCR nos permiten observar el efecto de SHOX al nivel de ARN endógeno de *HMGA2*, es decir, de una forma más biológica en comparación con los ensayos de luciferasa. Los resultados en células U2OS indicaron que SHOX activa la expresión de *HMGA2* de forma significativa e igual para las dos sondas estudiadas, de manera que la cantidad absoluta de ARN detectada con la sonda que abarca los exones 1-2 es mayor que la detectada por la sonda que abarca los exones 3-4, ya que la primera sonda es capaz de detectar un mayor número de transcritos de *HMGA2* que la segunda. Sorprendentemente, estos resultados no reproducen el efecto global de represión observado en los ensayos de luciferasa. Dado que *HMGA2* se expresa tan solo en tejido fetal y no en adulto (Cleynen et al, 2008), replicamos estos experimentos en la línea celular embrionaria HEK293 para asegurarnos de que no se trataba de un artefacto de la línea celular U2OS. Al obtener unos resultados muy similares a los anteriores, confirmamos que la

línea celular U2OS se comporta como un buen modelo para llevar a cabo estos estudios. La discrepancia de los resultados obtenidos mediante técnicas diferentes probablemente se debe a las limitaciones intrínsecas a los ensayos de luciferasa, ya que la secuencia genómica que se puede estudiar mediante dichos ensayos, tiene un tamaño muy limitado, de forma que se podrían estar pasando por alto interacciones genómicas que ocurren a una mayor escala y que pueden afectar a la regulación de SHOX sobre la región de *HMGA2* de estudio. Además, dado que se trata de un importante gen implicado en cáncer (Cleyne et al, 2008), ha de estar regulado de una manera muy precisa, probablemente a través de más de una ruta de señalización, factor que los ensayos de luciferasa pasan por alto, a diferencia de los ensayos de RT-PCR. Es por ello, que para verificar lo observado en los ensayos de luciferasa con los mutantes de SHOX, en el futuro llevaremos a cabo ensayos de RT-PCR para comprobar, al nivel de ARN mensajero, si los mutantes que anulan el dominio OAR de SHOX son capaces de activar o no la expresión de *HMGA2*, ya que nos sorprenden los resultados de los ensayos de luciferasa en los que SHOX no precisa el dominio OAR para poder ejercer su efecto sobre *HMGA2*, ya que se ha descrito que el dominio OAR es necesario para que SHOX transactive otros genes (Schneider et al, 2005).

Por otro lado, la existencia del pseudogen *RPSAP52* cuyo inicio se encuentra exactamente en la región del intrón 1 de *HMGA2* donde hemos identificado el nuevo promotor, y el efecto de promotor bidireccional de dicha región, nos sugiere que éste podría estar regulando a *RPSAP52* además de a *HMGA2* (Trinklein et al, 2004). Para comprobarlo, llevamos a cabo ensayos de RT-PCR para dicho pseudogen en presencia y ausencia de SHOX. Los resultados mostraron que la sobreexpresión de *SHOX* no afecta a la expresión endógena de *RPSAP52*, descartando así la hipótesis de que SHOX está regulando la expresión de *RPSAP52* en orientación 3'-5', además de a *HMGA2* en orientación 5'-3'.

## 2.2. Teorías sobre la función fisiológica de SHOX y HMGA2

*HMGA2* (*High Mobility Group AT-hook*) pertenece al grupo de proteínas no histónicas de alta movilidad (HMG). Mediante sus tres dominios *AT hook*, *HMGA2* es capaz de unirse a regiones ricas en AT del ADN por el surco menor. La parte C-terminal de la proteína la forma una cola ácida cuya función es desconocida. Las proteínas HMG se unen a estructuras específicas del ADN o cromatina de manera independiente de la secuencia, ya que reconocen estructuras más que una secuencia concreta de nucleótidos (Cleyne et al, 2007). *HMGA2* por sí mismo no tiene capacidad de regulación transcripcional (Wolffe et al, 1994), sino que, mediante su unión, modifica la estructura del ADN para generar cambios conformacionales que facilitan la interacción con otros factores de transcripción y así influye en actividades relacionadas con el ADN, que

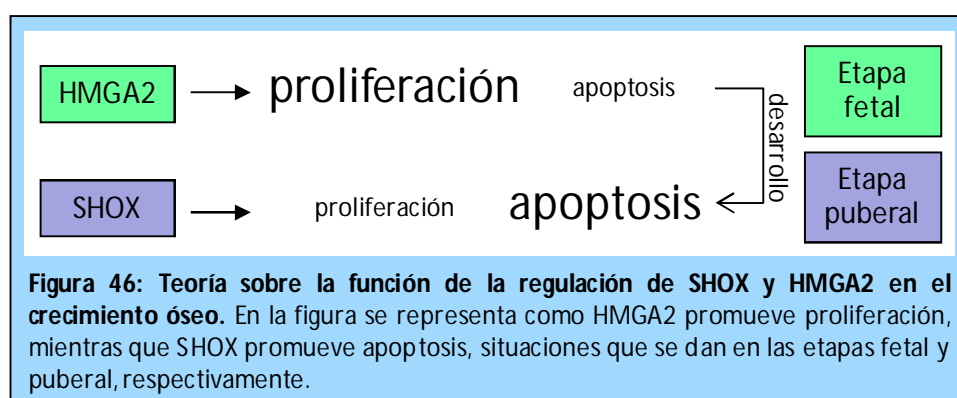
tienen como consecuencia el control del ciclo celular, la proliferación y la diferenciación (Cleynen et al, 2008).

Existen varias evidencias que muestran el importante papel que juega HMGA2 en el crecimiento humano y del ratón: el ratón knock-out para este gen resulta en un fenotipo pigmeo, que se caracteriza por un retraso en el crecimiento, y curiosamente, el ratón heterocigoto muestra un fenotipo más atenuado, sugiriendo un efecto dependiente de dosis (Zhou et al, 1995); la expresión en ratón de la proteína hmga2 truncada (exones 1 a 3) da lugar a gigantismo (Battista et al, 1999), lo que también se observó en un paciente con una inversión pericéntrica del cromosoma 12 que interrumpía *HMGA2* (Ligon et al, 2005); tres estudios GWAS asocian un polimorfismo en el extremo 3'UTR de *HMGA2* con la estatura (Lettre et al, 2008; Sanna et al, 2008; Weedon et al, 2007); un estudio reciente asocia un SNP de *HMGA2* con población extremadamente alta (Hendriks et al, 2011); otro estudio reciente mostró la asociación entre una repetición de dos nucleótidos en el extremo 5'UTR de *HMGA2* con el desarrollo de miomas uterinos y estatura reducida en mujeres (Hodge et al, 2009); la haploinsuficiencia de HMGA2 en el síndrome de la microdeleción 12q14 es responsable de la presencia de talla baja en estos pacientes (Menten 2007 PMID: 17220210); una deleción intragénica de *HMGA2* que abarca del intrón 2 al 3 del gen, cosegrega en una familia con talla baja idiopática (Buysse et al, 2009). El conjunto de estos datos muestra la implicación de HMGA2 en el crecimiento humano, pero los mecanismos subyacentes mediante los que afecta a la regulación del crecimiento, son aún desconocidos.

*HMGA2* se expresa de manera ubicua y abundante en tejido fetal, donde las células proliferan activamente, mientras que es prácticamente indetectable en tejidos adultos (Cleynen et al, 2008), pero sí se detecta en gran cantidad en tumores tanto malignos como benignos (Schoenmakers et al, 1995; Fusco and Fedele, 2007). Se ha visto que los fibroblastos embrionarios derivados de un ratón deficiente para *hmga2* crecen más lentamente que fibroblastos de ratón *wild type* (Zhou et al, 1995), sugiriendo que HMGA2 otorga a las células una ventaja en el crecimiento.

HMGA2 está implicado en el control del ciclo celular, de manera que induce la proliferación celular (Nishino et al, 2008) e inhibe la apoptosis (Natarajan et al, 2013). De forma opuesta, SHOX inhibe la proliferación e induce apoptosis y arresto del ciclo celular en células U2OS (Marchini et al, 2004). Dado que ambas proteínas están expresadas en los condrocitos de la placa de crecimiento humana, que SHOX promueve la expresión de *HMGA2* y que las patologías de las que *SHOX* es responsable son causa de un balance erróneo entre proliferación y diferenciación de los condrocitos, podemos suponer que el correcto balance entre SHOX y HMGA2 participa en el

control del ciclo celular de los condrocitos, y que es necesario para que el crecimiento óseo se de correctamente. El hecho de que *HMGA2* se exprese en etapas fetales, donde la proliferación es muy activa, pero no en la etapa puberal o adulta, da más fuerza a esta teoría (Figura 46). De esta forma, cuando existe haploinsuficiencia de *SHOX*, como en los casos de DLW, los niveles de expresión de *HMGA2* serán menores, por lo que la proliferación de los condrocitos disminuirá y aumentará su apoptosis, dando lugar a un crecimiento óseo reducido. En el caso de que *HMGA2* tenga una mutación de pérdida de función, el efecto sería el mismo, es decir, que el balance se inclinaría hacia la apoptosis de los condrocitos hipertróficos, causando el acortamiento de los huesos.



Por otro lado, se ha descrito que la expresión de *HMGA2* es dependiente de la ruta de señalización de TGF- $\beta$ , de manera que las proteínas Smad-2, -3 y -4 inducen su expresión (Thuault et al, 2006). A su vez, *HMGA2* regula la expresión de los factores de transcripción Snail, Slug, Twist y Id2 (*Inhibitor of differentiation 2*) (Thuault et al, 2006), todos ellos implicados en la regulación de la condrogénesis (De Frutos et al, 2007; Kim et al, 2010; Guzzo et al, 2011; Yang et al, 2009). Estos datos conectan por primera vez las acciones de *ADAMTSL3* y *HMGA2* mediante el eje de señalización de TGF- $\beta$  en el hueso en crecimiento. De esta manera, las alteraciones en *SHOX* pueden alterar los niveles de expresión tanto de *ADAMTSL3* como de *HMGA2*, a su vez, la alteración de los niveles normales de *ADAMTSL3* dará lugar a modificaciones en el eje de señalización de TGF- $\beta$  que alterarán la expresión de *HMGA2* y, en último término, afectarán al crecimiento normal del hueso.

### 2.3. Búsqueda de mutaciones y deleciones/duplicaciones en *HMGA2*

Durante la búsqueda de mutaciones en *HMGA2*, encontramos la variante p.P92A en un paciente diagnosticado con TBI. Esta variante es interesante, ya que las herramientas bioinformáticas coinciden en que podría ser patogénica y está presente en una muy baja

proporción de población general, 0.8% según *1000 genomes* y 0.6% en población española de estatura normal. Aun así, tanto el análisis de cosegregación como la puesta a punto de un ensayo funcional, son necesarias para poder confirmar la patogenicidad de este cambio. No se han encontrado deleciones ni duplicaciones en ningún exón de *HMGA2* en la cohorte estudiada.

Dada la gran importancia aparente de *HMGA2* en el crecimiento óseo y su dependencia de dosis, esperábamos encontrar pacientes con DLW o TBI que presentaran una mutación o una deleción en heterocigosis de *HMGA2* resultante en haploinsuficiencia, tal y como describieron Buysse y colaboradores en una familia que presentaba TBI (Buysse et al, 2009). Es por ello, que se continuará con la búsqueda de mutaciones en *HMGA2* en una cohorte mayor de pacientes con DLW y TBI sin defectos en *SHOX* o sus *enhancers*.

## CONCLUSIONES





## CONCLUSIONES ADAMTSL3

1. ADAMTSL3 colocaliza con SHOX en los condrocitos de la placa de crecimiento humana, por tanto, podemos implicar a ADAMTSL3 en las mismas rutas de señalización en las que SHOX puede estar participando dentro del hueso.
2. El gen *ADAMTSL3* está regulado por SHOX al nivel transcripcional. El sitio de unión de SHOX está localizado en el intrón 3 de *ADAMTSL3*. Esta región de *ADAMTSL3* contiene un elemento *enhancer*, cuya extensión se ha delimitado a 198 pb. Este *enhancer* opera de manera bidireccional y SHOX ejerce un efecto de represión sobre el mismo. Por tanto, SHOX reprime la expresión de *ADAMTSL3*.
3. Dicho *enhancer* de *ADAMTSL3* parece ser dependiente del tipo celular en el que se encuentra, de manera que es funcional en células mesenquimales (C3H/10T1/2) y de osteosarcoma (U2OS), pero no lo es en células embrionarias de riñón (HEK293).
4. Al igual que SHOX, los cofactores SOX5, SOX6 y SOX9, que juntos forman el trío de SOX, también tienen capacidad para reprimir el *enhancer* de *ADAMTSL3*. Pero el efecto se intensifica cuando cada uno de los cofactores se expresa junto a SHOX, mostrando un efecto de represión aditivo o sinérgico.
5. A pesar de que a día de hoy se desconoce la función de ADAMTSL3, hemos demostrado que interacciona con ADAMTS10. A su vez, está descrito que ADAMTS10 interactúa con la fibrilina-1, que es el reservorio de TGF- $\beta$  en la matriz extracelular. Por tanto, como ADAMTSL3 es una diana de transcripción de SHOX, nuestro trabajo sugiere, por primera vez, la existencia de una relación entre SHOX y el eje de regulación de TGF- $\beta$ .
6. Mediante el rastreo de mutaciones del gen *ADAMTSL3* en 116 pacientes con DLW y 175 pacientes con TBI, hemos identificado 9 variantes potencialmente patogénicas que podrían explicar el fenotipo de DLW y la talla baja en estos pacientes. No obstante, son necesarios estudios funcionales para confirmar su patogenicidad y con ello, su implicación como base molecular de la DLW y TBI.
7. Por tanto, nuestro trabajo implica por primera vez a *ADAMTSL3* en la etiopatogenia de la DLW y podría conectar, también por primera vez, al gen *SHOX* con el eje de señalización de TGF- $\beta$ , lo que sugiere que la fisiopatología de la DLW y la talla baja podría estar relacionada con TGF- $\beta$  y su vía de señalización.

## CONCLUSIONES HMGA2

1. HMGA2 colocaliza con SHOX en los condrocitos de la placa de crecimiento humana, por tanto, podemos implicar a HMGA2 en las mismas rutas de señalización en las que SHOX puede estar participando dentro del hueso.
2. El gen *HMGA2* está regulado por SHOX al nivel transcripcional. El sitio de unión de SHOX se localiza en el intrón 1 de *HMGA2*. En esta región hemos identificado un promotor, con una extensión máxima de 127 pb. También hemos demostrado que SHOX ejerce un efecto de represión sobre este promotor independientemente del tipo celular.
3. Es interesante, que dicho promotor opera de manera bidireccional, pero tan solo en células U2OS. En esta línea, hemos observado que existe un pseudogen, *RPSAP52*, cuyo inicio de transcripción se encuentra exactamente en el sitio de unión de SHOX a *HMGA2*, de manera que se transcribe en la orientación opuesta a *HMGA2*. Sin embargo, hemos demostrado que SHOX no afecta a los niveles de expresión de *RPSAP52*, al menos en células U2OS.
4. Mediante el rastreo de mutaciones del gen *HMGA2* en 116 pacientes con DLW y 175 pacientes con TBI, hemos identificado en un paciente con talla baja una nueva variante no sinónima que podría ser patogénica, lo que deberá ser confirmado mediante estudios funcionales específicos.
5. Por tanto, nuestro trabajo relaciona por primera vez a SHOX con el gen *HMGA2*, potencialmente implicando a dicho gen en la etiopatología de la DLW.

## **BIBLIOGRAFÍA**



- Abad V, Meyers JL, Weise M, Gafni RI, Barnes KM, Nilsson O, Bacher JD, Baron J. **(2002)**. The role of the resting zone in growth plate chondrogenesis. *Endocrinology*. 143(5):1851-7.
- Abu EO, Horner A, Kusec V, Triffitt JT, Compston JE. **(2000)**. The localization of the functional glucocorticoid receptor alpha in human bone. *J Clin Endocrinol Metab*. 85(2):883-9.
- Akan P, Sahlén M, Deloukas P. **(2009)**. A histone map of human chromosome 20q13.12. *PLoS One*. 4(2):e4479.
- Akiyama H, Chaboissier MC, Martin JF, Schedl A, de Crombrughe B. **(2002)**. The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes Dev*. 16(21):2813-28.
- Akiyama H, Lefebvre V. **(2011)**. Unraveling the transcriptional regulatory machinery in chondrogenesis. *J Bone Miner Metab*. 29(4):390-5.
- Aza-Carmona M, Shears DJ, Yuste-Checa P, Barca-Tierno V, Hisado-Oliva A, Belinchón A, Benito-Sanz S, Rodríguez JI, Argente J, Campos-Barros A, Scambler PJ, Heath KE. **(2011)**. SHOX interacts with the chondrogenic transcription factors SOX5 and SOX6 to activate the aggrecan enhancer. *Hum Mol Genet*. 15(20):1547-59.
- Aza-Carmona M, Barca-Tierno V, Hisado-Oliva A, Belinchón A, Gorbenko-del Blando D, Rodríguez JI, Benito Sanz S, Campos Barros A, Heath KE. **(2013)**. NPPB and ACAN, two novel SHOX2 transcription targets implicated in skeletal development. *Plos One*. En prensa.
- Banerjee-Basu S, Baxeavanis AD. **(2001)**. Molecular evolution of the homeodomain family of transcription factors. *Nucleic Acids Res*. 1;29(15):3258-69.
- Bartels CF, Bükülmez H, Padayatti P, Rhee DK, van Ravenswaaij-Arts C, Pauli RM, Mundlos S, Chitayat D, Shih LY, Al-Gazali LI, Kant S, Cole T, Morton J, Cormier-Daire V, Faivre L, Lees M, Kirk J, Mortier GR, Leroy J, Zabel B, Kim CA, Crow Y, Braverman NE, van den Akker F, Warman ML. **(2004)**. Mutations in the transmembrane natriuretic peptide receptor NPR-B impair skeletal growth and cause acromesomelic dysplasia, type Maroteaux. *Am J Hum Genet*. 75(1):27-34.
- Bassett JH, Williams GR. **(2003)**. The molecular actions of thyroid hormone in bone. *Trends Endocrinol Metab*. 14(8):356-64.
- Bassett JH, Williams GR. **(2009)**. The skeletal phenotypes of TRalpha and TRbeta mutant mice. *J Mol Endocrinol*. 42(4):269-82.
- Battista S, Fidanza V, Fedele M, Klein-Szanto AJ, Outwater E, Brunner H, Santoro M, Croce CM, Fusco A. **(1999)**. The expression of a truncated HMGI-C gene induces gigantism associated with lipomatosis. *Cancer Res*. 1;59(19):4793-7.
- Belin V, Cusin V, Viot G, Girlich D, Toutain A, Moncla A, Vekemans M, Le Merrer M, Munnich A, Cormier-Daire V. **(1998)**. SHOX mutations in dyschondrosteosis (Leri-Weill syndrome). *Nat Genet*. 19(1):67-9.
- Benito-Sanz S, Thomas NS, Huber C, Gorbenko del Blanco D, Aza-Carmona D, Crolla JA, Maloney V, Rappold G, Argente J, Campos-Barros A, Cormier-Daire V, Heath KE. **(2005)**. A novel class of

pseudoautosomal region 1 deletions downstream of SHOX is associated with Léri-Weill dyschondrosteosis. *Am J Hum Genet* 77:533–544.

Benito-Sanz S, Barroso E, Heine-Suñer D, Hisado-Oliva A, Romanelli V, Rosell J, Aragonés A, Caimari M, Argente J, Ross JL, Zinn AR, Gracia R, Lapunzina P, Campos-Barros A, Heath KE. (2011). Clinical and molecular evaluation of SHOX/PAR1 duplications in Leri-Weill dyschondrosteosis (LWD) and idiopathic short stature (ISS). *J Clin Endocrinol Metab*. 2011 Feb;96(2):E404-12.

Benito-Sanz S, Aza-Carmona M, Rodríguez-Estevez A, Rica-Etxebarria I, Gracia R, Campos-Barros A, Heath KE. (2012). Identification of the first PAR1 deletion encompassing upstream SHOX enhancers in a family with idiopathic short stature. *Eur J Hum Genet*. 20(1):125-7.

Benito-Sanz S, Royo JL, Barroso E, Paumard-Hernández B, Barreda-Bonis AC, Liu P, Gracia R, Lupski JR, Campos-Barros A, Gómez-Skarmeta JL, Heath KE. (2012). Identification of the first recurrent PAR1 deletion in Léri-Weill dyschondrosteosis and idiopathic short stature reveals the presence of a novel SHOX enhancer. *J Med Genet*. 49(7):442-50.

Berisio R, Ciccarelli L, Squeglia F, De Simone A, Vitagliano L. (2012). Structural and dynamic properties of incomplete immunoglobulin-like fold domains. *Protein Pept Lett*. 19(10):1045-53.

Bertorelli R, Capone L, Ambrosetti F, Garavelli L, Varriale L, Mazza V, Stanghellini I, Percesepe A, Forabosco A. (2007). The homozygous deletion of the 3' enhancer of the SHOX gene causes Langer mesomelic dysplasia. *Clin Genet*. 72(5):490-1.

Bi W, Deng JM, Zhang Z, Behringer RR, de Crombrughe B. (1999). Sox9 is required for cartilage formation. *Nat Genet*. 22(1):85-9.

Blaschke RJ, Töpfer C, Marchini A, Steinbeisser H, Janssen JW, Rappold GA. (2003). Transcriptional and translational regulation of the Leri-Weill and Turner syndrome homeobox gene SHOX. *J Biol Chem*. 28;278(48):47820-6.

Bobick BE, Cobb J. (2012). Shox2 regulates progression through chondrogenesis in the mouse proximal limb. *J Cell Sci*. 15;125(Pt 24):6071-83.

Brunet LJ, McMahon JA, McMahon AP, Harland RM. (1998). Noggin, cartilage morphogenesis, and joint formation in the mammalian skeleton. *Science*. 29;280(5368):1455-7.

Buysse K, Reardon W, Mehta L, Costa T, Fagerstrom C, Kingsbury DJ, Anadiotis G, McGillivray BC, Hellemans J, de Leeuw N, de Vries BB, Speleman F, Menten B, Mortier G. (2009). The 12q14 microdeletion syndrome: additional patients and further evidence that HMGA2 is an important genetic determinant for human height. *Eur J Med Genet*. 52(2-3):101-7.

Campos-Barros A, Benito-Sanz S, Ross JL, Zinn AR, Heath KE. (2007). Compound heterozygosity of SHOX-encompassing and downstream PAR1 deletions results in Langer mesomelic dysplasia (LMD). *Am J Med Genet A*. 1;143A(9):933-8.

Carty CL, Johnson NA, Hutter CM, Reiner AP, Peters U, Tang H, Kooperberg C. (2012). Genome-wide association study of body height in African Americans: the Women's Health Initiative SNP Health Association Resource (SHARe). *Hum Mol Genet*. 1;21(3):711-20.

- Cawston TE, Wilson AJ. **(2006)**. Understanding the role of tissue degrading enzymes and their inhibitors in development and disease. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 20(5):983-1002.
- Chamary JV, Parmley JL, Hurst LD. **(2006)**. Hearing silence: non-neutral evolution at synonymous sites in mammals. *Nat Rev Genet*. 7(2):98-108.
- Chen J, Wildhardt G, Zhong Z, Röth R, Weiss B, Steinberger D, Decker J, Blum WF, Rappold G. **(2009)**. Enhancer deletions of the SHOX gene as a frequent cause of short stature: the essential role of a 250 kb downstream regulatory domain. *J Med Genet*. 46(12):834-9.
- Chrysis D, Ritzen EM, Säwendahl L. **(2003)**. Growth retardation induced by dexamethasone is associated with increased apoptosis of the growth plate chondrocytes. *J Endocrinol*. 176(3):331-7.
- Chusho H, Ogawa Y, Tamura N, Suda M, Yasoda A, Miyazawa T, Kishimoto I, Komatsu Y, Itoh H, Tanaka K, Saito Y, Garbers DL, Nakao K. **(2000)**. Genetic models reveal that brain natriuretic peptide can signal through different tissue-specific receptor-mediated pathways. *Endocrinology*. 141(10):3807-13.
- Clement-Jones M, Schiller S, Rao E, Blaschke RJ, Zuniga A, Zeller R, Robson SC, Binder G, Glass I, Strachan T, Lindsay S, Rappold GA. **(2000)**. The short stature homeobox gene SHOX is involved in skeletal abnormalities in Turner syndrome. *Hum Mol Genet*. 9(5):695-702.
- Cleynen I, Brants JR, Peeters K, Deckers R, Debiec-Rychter M, Sciote R, Van de Ven WJ, Petit MM. **(2007)**. HMGA2 regulates transcription of the *Imp2* gene via an intronic regulatory element in cooperation with nuclear factor-kappaB. *Mol Cancer Res*. 5(4):363-72.
- Cleynen I, Van de Ven WJ. **(2008)**. The HMGA proteins: a myriad of functions (Review). *Int J Oncol*. 32(2):289-305.
- Cohen P, Rogol AD, Deal CL, Saenger P, Reiter EO, Ross JL, Chernausk SD, Savage MO, Wit JM; 2007 ISS Consensus Workshop participants. **(2008)**. Consensus statement on the diagnosis and treatment of children with idiopathic short stature: a summary of the Growth Hormone Research Society, the Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society, and the European Society for Paediatric Endocrinology Workshop. *J Clin Endocrinol Metab* 93(11):4210-7.
- Colvin JS, Bohne BA, Harding GW, McEwen DG, Ornitz DM. **(1996)**. Skeletal overgrowth and deafness in mice lacking fibroblast growth factor receptor 3. *Nat Genet*. 12(4):390-7.
- Dagoneau N, Benoist-Lasselin C, Huber C, Faivre L, Mégarbané A, Alswaid A, Dollfus H, Alembik Y, Munnich A, Legeai-Mallet L, Cormier-Daire V. **(2004)**. ADAMTS10 mutations in autosomal recessive Weill-Marchesani syndrome. *Am J Hum Genet*. 75(5):801-6.
- De Crombrughe B, Lefebvre V, Behringer RR, Bi W, Murakami S, Huang W. **(2000)**. Transcriptional mechanisms of chondrocyte differentiation. *Matrix Biol*. 19(5):389-94.
- Decker E, Durand C, Bender S, Rödelberger C, Glaser A, Hecht J, Schneider KU, Rappold G. **(2011)**. FGFR3 is a target of the homeobox transcription factor SHOX in limb development. *Hum Mol Genet*. 20(8):1524-35.
- Deng C, Wynshaw-Boris A, Zhou F, Kuo A, Leder P. **(1996)**. Fibroblast growth factor receptor 3 is a negative regulator of bone growth. *Cell*. 22;84(6):911-21.

- Dünker N, Kriegelstein K. **(2002)**. Tgfbeta2 -/- Tgfbeta3 -/- double knockout mice display severe midline fusion defects and early embryonic lethality. *Anat Embryol (Berl)*. 206(1-2):73-83.
- Durand C, Bangs F, Signolet J, Decker E, Tickle C, Rappold G. **(2010)**. Enhancer elements upstream of the SHOX gene are active in the developing limb. *Eur J Hum Genet*. 18(5):527-32.
- Durand C, Decker E, Roeth R, Schneider KU, Rappold G. **(2012)**. The homeobox transcription factor HOXA9 is a regulator of SHOX in U2OS cells and chicken micromass cultures. *PLoS One*. 7(9):e45369.
- Ellison JW, Wardak Z, Young MF, Gehron Robey P, Laig-Webster M, Chiong W. **(1997)**. PHOG, a candidate gene for involvement in the short stature of Turner syndrome. *Hum Mol Genet*. 6(8):1341-7.
- Faivre L, Gorlin RJ, Wirtz MK, Godfrey M, Dagoneau N, Samples JR, Le Merrer M, Collod-Beroud G, Boileau C, Munnich A, Cormier-Daire V. **(2003)**. In frame fibrillin-1 gene deletion in autosomal dominant Weill-Marchesani syndrome. *J Med Genet*. 40(1):34-6.
- Falcinelli C, Iughetti L, Percesepe A, Calabrese G, Chiarelli F, Cisternino M, De Sanctis L, Pucarelli I, Radetti G, Wasniewska M, Weber G, Stuppia L, Bernasconi S, Forabosco A. **(2002)**. SHOX point mutations and deletions in Leri-Weill dyschondrosteosis. *J Med Genet*. 39(6):E33.
- de Frutos CA, Vega S, Manzanares M, Flores JM, Huertas H, Martínez-Frías ML, Nieto MA. **(2007)**. Snail1 is a transcriptional effector of FGFR3 signaling during chondrogenesis and achondroplasias. *Dev Cell*. 13(6):872-83.
- Fukami M, Kato F, Tajima T, Yokoya S, Ogata T. **(2006)**. Transactivation function of an approximately 800-bp evolutionarily conserved sequence at the SHOX 3' region: implication for the downstream enhancer. *Am J Hum Genet*. 78(1):167-70.
- Fusco A, Fedele M. **(2007)**. Roles of HMGA proteins in cancer. *Nat Rev Cancer*. 7(12):899-910.
- Gabriel LA, Wang LW, Bader H, Ho JC, Majors AK, Hollyfield JG, Traboulsi EI, Apte SS. **(2012)**. ADAMTSL4, a secreted glycoprotein widely distributed in the eye, binds fibrillin-1 microfibrils and accelerates microfibril biogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 53(1):461-9.
- Gafni RI, Weise M, Robrecht DT, Meyers JL, Barnes KM, De-Levi S, Baron J. **(2001)**. Catch-up growth is associated with delayed senescence of the growth plate in rabbits. *Pediatr Res*. 50(5):618-23.
- Gehring WJ, Qian YQ, Billeter M, Furukubo-Tokunaga K, Schier AF, Resendez-Perez D, Affolter M, Otting G, Wüthrich K. **(1994)**. Homeodomain-DNA recognition. *Cell*. 78(2):211-23.
- Geiser AG, Hummel CW, Draper MW, Henck JW, Cohen IR, Rudmann DG, Donnelly KB, Adrian MD, Shepherd TA, Wallace OB, McCann DJ, Oldham SW, Bryant HU, Sato M, Dodge JA. **(2005)**. A new selective estrogen receptor modulator with potent uterine antagonist activity, agonist activity in bone, and minimal ovarian stimulation. *Endocrinology*. 146(10):4524-35.



Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N. **(1999)**. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med*. 5(6):623-8.

Gläsker S, Vortmeyer AO, Lafferty AR, Hofman PL, Li J, Weil RJ, Zhuang Z, Oldfield EH. **(2011)**. Hereditary pituitary hyperplasia with infantile gigantism. *J Clin Endocrinol Metab*. 96(12):E2078-87.

Grigelioniene G, Eklöf O, Ivarsson SA, Westphal O, Neumeyer L, Kedra D, Dumanski J, Hagenäs L. **(2000)**. Mutations in short stature homeobox containing gene (SHOX) in dyschondrosteosis but not in hypochondroplasia. *Hum Genet*. 107(2):145-9.

Grigelioniene G, Schoumans J, Neumeyer L, Ivarsson A, Eklöf O, Enkvist O, Tordai P, Fosdal I, Myhre AG, Westphal O, Nilsson NO, Elfving M, Ellis I, Anderlid BM, Fransson I, Tapia-Paez I, Nordenskjöld M, Hagenäs L, Dumanski JP. Nordenskjöld M, Hagenäs L, Dumanski JP. **(2001)**. Analysis of short stature homeobox-containing gene (SHOX) and auxological phenotype in dyschondrosteosis and isolated Madelung deformity. *Hum Genet*. 109(5):551-8.

Grumbach MM. **(2000)**. The role of estrogen in the male and female: evidence from mutations in synthesis and action. *Horm Res*. 53 Suppl 3:23-4.

Gudbjartsson DF, Walters GB, Thorleifsson G, Stefansson H, Halldorsson BV, Zusmanovich P, Sulem P, Thorlacius S, Gylfason A, Steinberg S, Helgadóttir A, Ingason A, Steinthorsdóttir V, Olafsdóttir EJ, Olafsdóttir GH, Jonsson T, Borch-Johnsen K, Hansen T, Andersen G, Jorgensen T, Pedersen O, Aben KK, Witjes JA, Swinkels DW, den Heijer M, Franke B, Verbeek AL, Becker DM, Yanek LR, Becker LC, Tryggvadóttir L, Rafnar T, Gulcher J, Kiemeneý LA, Kong A, Thorsteinsdóttir U, Stefansson K. **(2008)**. Many sequence variants affecting diversity of adult human height. *Nat Genet*. 40(5):609-15.

Guo J, Chung UI, Yang D, Karsenty G, Bringhurst FR, Kronenberg HM. **(2006)**. PTH/PTHrP receptor delays chondrocyte hypertrophy via both Runx2-dependent and -independent pathways. *Dev Biol*. 1;292(1):116-28. Epub 2006 Feb 14.

Guzzo RM, Andreeva V, Spicer DB, Drissi MH. **(2011)**. Persistent expression of Twist1 in chondrocytes causes growth plate abnormalities and dwarfism in mice. *Int J Dev Biol*. 55(6):641-7.

Hall NG, Klenotic P, Anand-Apte B, Apte SS. **(2003)**. ADAMTSL-3/punctin-2, a novel glycoprotein in extracellular matrix related to the ADAMTS family of metalloproteases. *Matrix Biol*. 22(6):501-10.

Hankenson KD, Sweetwyne MT, Shitaye H, Posey KL. **(2010)**. Thrombospondins and novel TSR-containing proteins, R-spondins, regulate bone formation and remodeling. *Curr Osteoporos Rep*. 8(2):68-76.

Hayward C, Keston M, Brock DJ, Dietz HC. **(1992)**. Fibrillin (FBN1) mutations in Marfan syndrome. *Hum Mutat*. 1(1):79.

Hendriks AE, Brown MR, Boot AM, Oostra BA, Drop SL, Parks JS. **(2011)**. Genetic variation in candidate genes like the HMGA2 gene in the extremely tall. *Horm Res Paediatr*. 76(5):307-13.

- Hodge JC, T Cuenco K, Huyck KL, Somasundaram P, Panhuysen CI, Stewart EA, Morton CC. **(2009)**. Uterine leiomyomata and decreased height: a common HMGA2 predisposition allele. *Hum Genet.* 125(3):257-63.
- Horton WE Jr, Wang L, Bradham D, Precht P, Balakir R. **(1992)**. The control of expression of type II collagen: relevance to cartilage disease. *DNA Cell Biol.* 11(3):193-8.
- Isaksson OG, Lindahl A, Nilsson A, Isgaard J. **(1987)**. Mechanism of the stimulatory effect of growth hormone on longitudinal bone growth. *Endocr Rev.* 8(4):426-38.
- Isgaard J, Möller C, Isaksson OG, Nilsson A, Mathews LS, Norstedt G. **(1988)**. Regulation of insulin-like growth factor messenger ribonucleic acid in rat growth plate by growth hormone. *Endocrinology.* 122(4):1515-20.
- Isogai Z, Ono RN, Ushiro S, Keene DR, Chen Y, Mazziere R, Charbonneau NL, Reinhardt DP, Rifkin DB, Sakai LY. **(2003)**. Latent transforming growth factor beta-binding protein 1 interacts with fibrillin and is a microfibril-associated protein. *J Biol Chem.* 278(4):2750-7.
- Jaubert J, Jaubert F, Martin N, Washburn LL, Lee BK, Eicher EM, Guénet JL. **(1999)**. Three new allelic mouse mutations that cause skeletal overgrowth involve the natriuretic peptide receptor C gene (*Npr3*). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(18):10278-83.
- Jenuwein T, Allis CD. **(2001)**. Translating the histone code. *Science.* 293(5532):1074-80.
- Karp SJ, Schipani E, St-Jacques B, Hunzelman J, Kronenberg H, McMahon AP. **(2000)**. Indian hedgehog coordinates endochondral bone growth and morphogenesis via parathyroid hormone related-protein-dependent and -independent pathways. *Development.* 127(3):543-8.
- Karperien M, van Dijk TB, Hoeijmakers T, Cremers F, Abou-Samra AB, Boonstra J, de Laat SW, Defize LH. **(1994)**. Expression pattern of parathyroid hormone/parathyroid hormone related peptide receptor mRNA in mouse postimplantation embryos indicates involvement in multiple developmental processes. *Mech Dev.* 47(1):29-42.
- Kim D, Song J, Jin EJ. **(2010)**. MicroRNA-221 regulates chondrogenic differentiation through promoting proteasomal degradation of slug by targeting Mdm2. *J Biol Chem.* 285(35):26900-7.
- Kimchi-Sarfaty C, Oh JM, Kim IW, Sauna ZE, Calcagno AM, Ambudkar SV, Gottesman MM. **(2007)**. A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science.* 315(5811):525-8.
- Kinoshita A, Saito T, Tomita H, Makita Y, Yoshida K, Ghadami M, Yamada K, Kondo S, Ikegawa S, Nishimura G, Fukushima Y, Nakagomi T, Saito H, Sugimoto T, Kamegaya M, Hisa K, Murray JC, Taniguchi N, Niikawa N, Yoshiura K. **(2000)**. Domain-specific mutations in *TGFB1* result in Camurati-Engelmann disease. *Nat Genet.* 26(1):19-20.
- Kragelund C, Grønning B, Køber L, Hildebrandt P, Steffensen R. **(2005)**. N-terminal pro-B-type natriuretic peptide and long-term mortality in stable coronary heart disease. *N Engl J Med.* 352(7):666-75.
- Kronenberg HM. **(2003)**. Developmental regulation of the growth plate. *Nature.* 423(6937):332-6.

- Kronenberg HM. **(2006)**. PTHrP and skeletal development. *Ann N Y Acad Sci.* 1068:1-13.
- Kofoed EM, Hwa V, Little B, Woods KA, Buckway CK, Tsubaki J, Pratt KL, Bezrodnik L, Jasper H, Tepper A, Heinrich JJ, Rosenfeld RG. **(2003)**. Growth hormone insensitivity associated with a STAT5b mutation. *N Engl J Med.* 18;349(12):1139-47.
- Kutz WE, Wang LW, Dagoneau N, Odrčić KJ, Cormier-Daire V, Traboulsi EI, Apte SS. **(2008)**. Functional analysis of an ADAMTS10 signal peptide mutation in Weill-Marchesani syndrome demonstrates a long-range effect on secretion of the full-length enzyme. *Hum Mutat.* 29(12):1425-34.
- Kutz WE, Wang LW, Bader HL, Majors AK, Iwata K, Traboulsi EI, Sakai LY, Keene DR, Apte SS. **(2011)**. ADAMTS10 protein interacts with fibrillin-1 and promotes its deposition in extracellular matrix of cultured fibroblasts. *J Biol Chem.* 13;286(19):17156-67.
- Lanske B, Karaplis AC, Lee K, Luz A, Vortkamp A, Pirro A, Karperien M, Defize LH, Ho C, Mulligan RC, Abou-Samra AB, Jüppner H, Segre GV, Kronenberg HM. **(1996)**. PTH/PTHrP receptor in early development and Indian hedgehog-regulated bone growth. *Science.* 2;273(5275):663-6.
- Lawler J, Hynes RO. **(1986)**. The structure of human thrombospondin, an adhesive glycoprotein with multiple calcium-binding sites and homologies with several different proteins. *J Cell Biol.* 103(5):1635-48.
- Le Goff C, Morice-Picard F, Dagoneau N, Wang LW, Perrot C, Crow YJ, Bauer F, Flori E, Prost-Squarcioni C, Krakow D, Ge G, Greenspan DS, Bonnet D, Le Merrer M, Munnich A, Apte SS, Cormier-Daire V. **(2008)**. ADAMTS2 mutations in geleophysic dysplasia demonstrate a role for ADAMTS-like proteins in TGF-beta bioavailability regulation. *Nat Genet.* 40(9):1119-23.
- Le Goff C, Mahaut C, Abhyankar A, Le Goff W, Serre V, Afenjar A, Destrée A, di Rocco M, Héron D, Jacquemont S, Marlin S, Simon M, Tolmie J, Verloes A, Casanova JL, Munnich A, Cormier-Daire V. **(2011)**. Mutations at a single codon in Mad homology 2 domain of SMAD4 cause Myhre syndrome. *Nat Genet.* 11;44(1):85-8.
- Le Goff C, Mahaut C, Wang LW, Allali S, Abhyankar A, Jensen S, Zylberberg L, Collod-Beroud G, Bonnet D, Alanay Y, Brady AF, Cordier MP, Devriendt K, Genevieve D, Kiper PÖ, Kitoh H, Krakow D, Lynch SA, Le Merrer M, Mégarbane A, Mortier G, Odent S, Polak M, Rohrbach M, Sillence D, Stolte-Dijkstra I, Superti-Furga A, Rimo DL, Topouchian V, Unger S, Zabel B, Bole-Feysot C, Nitschke P, Handford P, Casanova JL, Boileau C, Apte SS, Munnich A, Cormier-Daire V. **(2011)**. Mutations in the TGFβ binding-protein-like domain 5 of FBN1 are responsible for acromicric and geleophysic dysplasias. *Am J Hum Genet.* 15;89(1):7-14.
- Le Goff C, Cormier-Daire V. **(2012)**. From tall to short: the role of TGFβ signaling in growth and its disorders. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 15;160C(3):145-53.
- Lefebvre V, Li P, de Crombrughe B. **(1998)**. A new long form of Sox5 (L-Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene. *EMBO J.* 1;17(19):5718-33.
- Lefebvre V. **(2002)**. Toward understanding the functions of the two highly related Sox5 and Sox6 genes. *J Bone Miner Metab.* 20(3):121-30.

Lefebvre V, Smits P. **(2005)**. Transcriptional control of chondrocyte fate and differentiation. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 75(3):200-12.

Lettre G, Jackson AU, Gieger C, Schumacher FR, Berndt SI, Sanna S, Eyheramendy S, Voight BF, Butler JL, Guiducci C, Illig T, Hackett R, Heid IM, Jacobs KB, Lyssenko V, Uda M; Diabetes Genetics Initiative; FUSION; KORA; Prostate, Lung Colorectal and Ovarian Cancer Screening Trial; Nurses' Health Study; SardiNIA, Boehnke M, Chanock SJ, Groop LC, Hu FB, Isomaa B, Kraft P, Peltonen L, Salomaa V, Schlessinger D, Hunter DJ, Hayes RB, Abecasis GR, Wichmann HE, Mohlke KL, Hirschhorn JN. **(2008)**. Identification of ten loci associated with height highlights new biological pathways in human growth. *Nat Genet*. 40(5):584-91.

Ligon AH, Moore SD, Parisi MA, Mealiffe ME, Harris DJ, Ferguson HL, Quade BJ, Morton CC. **(2005)**. Constitutional rearrangement of the architectural factor HMGA2: a novel human phenotype including overgrowth and lipomas. *Am J Hum Genet*. 76(2):340-8.

Little CB, Mittaz L, Belluoccio D, Rogerson FM, Campbell IK, Meeker CT, Bateman JF, Pritchard MA, Fosang AJ. **(2005)**. ADAMTS-1-knockout mice do not exhibit abnormalities in aggrecan turnover in vitro or in vivo. *Arthritis Rheum*. 52(5):1461-72.

Liu JZ, Medland SE, Wright MJ, Henders AK, Heath AC, Madden PA, Duncan A, Montgomery GW, Martin NG, McRae AF. **(2010)**. Genome-wide association study of height and body mass index in Australian twin families. *Twin Res Hum Genet*. 13(2):179-93.

Loeys BL, Chen J, Neptune ER, Judge DP, Podowski M, Holm T, Meyers J, Leitch CC, Katsanis N, Sharifi N, Xu FL, Myers LA, Spevak PJ, Cameron DE, De Backer J, Hellemans J, Chen Y, Davis EC, Webb CL, Kress W, Coucke P, Rifkin DB, De Paepe AM, Dietz HC. **(2005)**. A syndrome of altered cardiovascular, craniofacial, neurocognitive and skeletal development caused by mutations in TGFBR1 or TGFBR2. *Nat Genet*. 37(3):275-81.

Mackie EJ, Ahmed YA, Tatarczuch L, Chen KS, Mirams M. **(2008)**. Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton. *Int J Biochem Cell Biol*. 40(1):46-62.

Mann RS, Lelli KM, Joshi R. **(2009)**. Hox specificity unique roles for cofactors and collaborators. *Curr Top Dev Biol*. 88:63-101.

Marchini A, Marttila T, Winter A, Caldeira S, Malanchi I, Blaschke RJ, Häcker B, Rao E, Karperien M, Wit JM, Richter W, Tommasino M, Rappold GA. **(2004)**. The short stature homeodomain protein SHOX induces cellular growth arrest and apoptosis and is expressed in human growth plate chondrocytes. *J Biol Chem*. 279(35):37103-14.

Marchini A, Häcker B, Marttila T, Hesse V, Emons J, Weiss B, Karperien M, Rappold G. **(2007)**. BNP is a transcriptional target of the short stature homeobox gene SHOX. *Hum Mol Genet*. 15(24):3081-7.

Menten B, Buysse K, Zahir F, Hellemans J, Hamilton SJ, Costa T, Fagerstrom C, Anadiotis G, Kingsbury D, McGillivray BC, Marra MA, Friedman JM, Speleman F, Mortier G. **(2007)**. Osteopoikilosis, short stature and mental retardation as key features of a new microdeletion syndrome on 12q14. *J Med Genet*. 44(4):264-8.

- Minina E, Wenzel HM, Kreschel C, Karp S, Gaffield W, McMahon AP, Vortkamp A. **(2001)**. BMP and Ihh/PTHrP signaling interact to coordinate chondrocyte proliferation and differentiation. *Development*. 128(22):4523-34.
- Minina E, Kreschel C, Naski MC, Ornitz DM, Vortkamp A. **(2002)**. Interaction of FGF, Ihh/Pthlh, and BMP signaling integrates chondrocyte proliferation and hypertrophic differentiation. *Dev Cell*. 3(3):439-49.
- Miura M, Tanaka K, Komatsu Y, Suda M, Yasoda A, Sakuma Y, Ozasa A, Nakao K. **(2002)**. Thyroid hormones promote chondrocyte differentiation in mouse ATDC5 cells and stimulate endochondral ossification in fetal mouse tibias through iodothyronine deiodinases in the growth plate. *J Bone Miner Res*. 17(3):443-54.
- Munns CF, Glass IA, LaBrom R, Hayes M, Flanagan S, Berry M, Hyland VJ, Batch JA, Philips GE, Vickers D. **(2001)**. Histopathological analysis of Leri-Weill dyschondrosteosis: disordered growth plate. *Hand Surg*. 6(1):13-23.
- Munns CJ, Haase HR, Crowther LM, Hayes MT, Blaschke R, Rappold G, Glass IA, Batch JA. **(2004)**. Expression of SHOX in human fetal and childhood growth plate. *J Clin Endocrinol Metab*. 89(8):4130-5.
- Muragaki Y, Mariman EC, van Beersum SE, Perälä M, van Mourik JB, Warman ML, Hamel BC, Olsen BR. **(1996)**. A mutation in COL9A2 causes multiple epiphyseal dysplasia (EDM2). *Ann N Y Acad Sci*. 8;785:303-6.
- N'Diaye A, Chen GK, Palmer CD, Ge B, Tayo B, Mathias RA, Ding J, Nalls MA, Adeyemo A, Adoue V, Ambrosone CB, Atwood L, Bandera EV, Becker LC, Berndt SI, Bernstein L, Blot WJ, Boerwinkle E, Britton A, Casey G, Chanock SJ, Demerath E, Deming SL, Diver WR, Fox C, Harris TB, Hernandez DG, Hu JJ, Ingles SA, John EM, Johnson C, Keating B, Kittles RA, Kolonel LN, Kritchevsky SB, Le Marchand L, Lohman K, Liu J, Millikan RC, Murphy A, Musani S, Neslund-Dudas C, North KE, Nyante S, Ogunniyi A, Ostrander EA, Papanicolaou G, Patel S, Pettaway CA, Press MF, Redline S, Rodriguez-Gil JL, Rotimi C, Rybicki BA, Salako B, Schreiner PJ, Signorello LB, Singleton AB, Stanford JL, Stram AH, Stram DO, Strom SS, Suktitipat B, Thun MJ, Witte JS, Yanek LR, Ziegler RG, Zheng W, Zhu X, Zmuda JM, Zonderman AB, Evans MK, Liu Y, Becker DM, Cooper RS, Pastinen T, Henderson BE, Hirschhorn JN, Lettre G, Haiman CA. **(2011)**. Identification, replication, and fine-mapping of Loci associated with adult height in individuals of african ancestry. *PLoS Genet*. 7(10):e1002298.
- Nackley AG, Shabalina SA, Tchivileva IE, Satterfield K, Korchynskyi O, Makarov SS, Maixner W, Diatchenko L. **(2006)**. Human catechol-O-methyltransferase haplotypes modulate protein expression by altering mRNA secondary structure. *Science*. 22;314(5807):1930-3.
- Natarajan S, Hombach-Klonisch S, Dröge P, Klonisch T. **(2013)**. HMGA2 inhibits apoptosis through interaction with ATR-CHK1 signaling complex in human cancer cells. *Neoplasia*. 15(3):263-80.
- Ng LJ, Wheatley S, Muscat GE, Conway-Campbell J, Bowles J, Wright E, Bell DM, Tam PP, Cheah KS, Koopman P. **(1997)**. SOX9 binds DNA, activates transcription, and coexpresses with type II collagen during chondrogenesis in the mouse. *Dev Biol*. 1;183(1):108-21.
- Nicolosi A, Caruso-Nicoletti M. **(2010)**. Epidemiology of SHOX deficiency. *J Endocrinol Invest*. 33(6 Suppl):7-10.

- Niesler B, Fischer C, Rappold GA. **(2002)**. The human SHOX mutation database. *Hum Mutat.* 20(5):338-41.
- Nilsson O, Baron J. **(2005)**. Impact of growth plate senescence on catch-up growth and epiphyseal fusion. *Pediatr Nephrol.* 20(3):319-22.
- Nishino J, Kim I, Chada K, Morrison SJ. **(2008)**. Hmga2 promotes neural stem cell self-renewal in young but not old mice by reducing p16Ink4a and p19Arf Expression. *Cell.* 17;135(2):227-39.
- Ohlsson C, Nilsson A, Isaksson O, Lindahl A. **(1992)**. Growth hormone induces multiplication of the slowly cycling germinal cells of the rat tibial growth plate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 15;89(20):9826-30.
- Ornitz DM, Marie PJ. **(2002)**. FGF signaling pathways in endochondral and intramembranous bone development and human genetic disease. *Genes Dev.* 15;16(12):1446-65.
- Ornitz DM. **(2005)**. FGF signaling in the developing endochondral skeleton. *Cytokine Growth Factor Rev.* 16(2):205-13.
- Ortega N, Behonick D, Stickens D, Werb Z. **(2003)**. How proteases regulate bone morphogenesis. *Ann N Y Acad Sci.* 995:109-16.
- Oz OK, Millsaps R, Welch R, Birch J, Zerwekh JE. **(2001)**. Expression of aromatase in the human growth plate. *J Mol Endocrinol.* 27(2):249-53.
- Pizette S, Niswander L. **(2000)**. BMPs are required at two steps of limb chondrogenesis: formation of prechondrogenic condensations and their differentiation into chondrocytes. *Dev Biol.* 15;219(2):237-49.
- Provot S, Kempf H, Murtaugh LC, Chung UI, Kim DW, Chyung J, Kronenberg HM, Lassar AB. **(2006)**. Nkx3.2/Bapx1 acts as a negative regulator of chondrocyte maturation. *Development.* 133(4):651-62.
- Putnam EA, Zhang H, Ramirez F, Milewicz DM. **(1995)**. Fibrillin-2 (FBN2) mutations result in the Marfan-like disorder, congenital contractural arachnodactyly. *Nat Genet.* 11(4):456-8.
- Ramel MC, Hill CS. **(2012)**. Spatial regulation of BMP activity. *FEBS Lett.* 586(14):1929-41.
- Ramirez F, Dietz HC. **(2007)**. Marfan syndrome: from molecular pathogenesis to clinical treatment. *Curr Opin Genet Dev.* 17(3):252-8.
- Rao E, Weiss B, Fukami M, Rump A, Niesler B, Mertz A, Muroya K, Binder G, Kirsch S, Winkelmann M, Nordsiek G, Heinrich U, Breuning MH, Ranke MB, Rosenthal A, Ogata T, Rappold GA. **(1997)**. Pseudoautosomal deletions encompassing a novel homeobox gene cause growth failure in idiopathic short stature and Turner syndrome. *Nat Genet.* 16(1):54-63.
- Rao E, Blaschke RJ, Marchini A, Niesler B, Burnett M, Rappold GA. **(2001)**. The Leri-Weill and Turner syndrome homeobox gene SHOX encodes a cell-type specific transcriptional activator. *Hum Mol Genet.* 15;10(26):3083-91.
- Reddi AH. **(2001)**. Interplay between bone morphogenetic proteins and cognate binding proteins in bone and cartilage development: noggin, chordin and DAN. *Arthritis Res.* 3(1):1-5.

Robson H, Siebler T, Stevens DA, Shalet SM, Williams GR. **(2000)**. Thyroid hormone acts directly on growth plate chondrocytes to promote hypertrophic differentiation and inhibit clonal expansion and cell proliferation. *Endocrinology*. 141(10):3887-97.

Rosenfeld RG, Bengtsson BA. **(1994)**. Effects of growth hormone and insulin-like growth factors on the central nervous system. *Acta Paediatr Suppl*. 406:89-91.

Ross M y Pawlina W. *Histología*. 5ª ed, editorial médica panamericana.

Rossi A, Superti-Furga A. **(2001)**. Mutations in the diastrophic dysplasia sulfate transporter (DTDST) gene (SLC26A2): 22 novel mutations, mutation review, associated skeletal phenotypes, and diagnostic relevance. *Hum Mutat*. 17(3):159-71.

Rudolph KM, Liaw GJ, Daniel A, Green P, Courey AJ, Hartenstein V, Lengyel JA. **(1997)**. Complex regulatory region mediating tailless expression in early embryonic patterning and brain development. *Development*. 124(21):4297-308.

Ruoslahti E. **(1991)**. Integrins. *J Clin Invest*. 87(1):1-5.

Sanna S, Jackson AU, Nagaraja R, Willer CJ, Chen WM, Bonnycastle LL, Shen H, Timpson N, Lettre G, Usala G, Chines PS, Stringham HM, Scott LJ, Dei M, Lai S, Albai G, Crisponi L, Naitza S, Doheny KF, Pugh EW, Ben-Shlomo Y, Ebrahim S, Lawlor DA, Bergman RN, Watanabe RM, Uda M, Tuomilehto J, Coresh J, Hirschhorn JN, Shuldiner AR, Schlessinger D, Collins FS, Davey Smith G, Boerwinkle E, Cao A, Boehnke M, Abecasis GR, Mohlke KL. **(2008)**. Common variants in the GDF5-UQC region are associated with variation in human height. *Nat Genet*. 40(2):198-203.

Sabherwal N, Blaschke RJ, Marchini A, Heine-Suner D, Rosell J, Ferragut J, Blum WF, Rappold G. **(2004a)**. A novel point mutation A170P in the SHOX gene defines impaired nuclear translocation as a molecular cause for Léri-Weill dyschondrosteosis and Langer dysplasia. *J Med Genet*. 41(6):e83.

Sabherwal N, Schneider KU, Blaschke RJ, Marchini A, Rappold G. **(2004b)**. Impairment of SHOX nuclear localization as a cause for Léri-Weill syndrome. *J Cell Sci*. 15;117(Pt 14):3041-8.

Sabherwal N, Bangs F, Röth R, Weiss B, Jantz K, Tiecke E, Hinkel GK, Spaich C, Hauffa BP, van der Kamp H, Kapeller J, Tickle C, Rappold G. **(2007)**. Long-range conserved non-coding SHOX sequences regulate expression in developing chicken limb and are associated with short stature phenotypes in human patients. *Hum Mol Genet*. 15;16(2):210-22.

Sauna ZE, Kimchi-Sarfaty C. **(2011)**. Understanding the contribution of synonymous mutations to human disease. *Nat Rev Genet*. 31;12(10):683-91.

Schmidt C, Fischer G, Kadner H, Genersch E, Kühn K, Pöschl E. **(1993)**. Differential effects of DNA-binding proteins on bidirectional transcription from the common promoter region of human collagen type IV genes COL4A1 and COL4A2. *Biochim Biophys Acta*. 18;1174(1):1-10.

Schneider KU, Marchini A, Sabherwal N, Röth R, Niesler B, Marttila T, Blaschke RJ, Lawson M, Dumic M, Rappold G. **(2005)**. Alteration of DNA binding, dimerization, and nuclear translocation of SHOX homeodomain mutations identified in idiopathic short stature and Leri-Weill dyschondrosteosis. *Hum Mutat*. 26(1):44-52.

Schlechter NL, Russell SM, Spencer EM, Nicoll CS. **(1986)**. Evidence suggesting that the direct growth-promoting effect of growth hormone on cartilage in vivo is mediated by local production of somatomedin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 83(20):7932-4.

Schoenmakers EF, Wanschura S, Mols R, Bullerdiek J, Van den Berghe H, Van de Ven WJ. **(1995)**. Recurrent rearrangements in the high mobility group protein gene, HMGI-C, in benign mesenchymal tumours. *Nat Genet*. 10(4):436-44.

Sengle G, Tsutsui K, Keene DR, Tufa SF, Carlson EJ, Charbonneau NL, Ono RN, Sasaki T, Wirtz MK, Samples JR, Fessler LI, Fessler JH, Sekiguchi K, Hayflick SJ, Sakai LY. **(2012)**. Microenvironmental regulation by fibrillin-1. *PLoS Genet*. 8(1):e1002425.

Shao YY, Wang L, Ballock RT. **(2006)**. Thyroid hormone and the growth plate. *Rev Endocr Metab Disord*. 7(4):265-71.

Shears DJ, Vassal HJ, Goodman FR, Palmer RW, Reardon W, Superti-Furga A, Scambler PJ, Winter RM. **(1998)**. Mutation and deletion of the pseudoautosomal gene SHOX cause Léri-Weill dyschondrosteosis. *Nat Genet* 19:70–73.

Silvestrini G, Ballanti P, Patacchioli FR, Mocetti P, Di Grezia R, Wedard BM, Angelucci L, Bonucci E. **(2000)**. Evaluation of apoptosis and the glucocorticoid receptor in the cartilage growth plate and metaphyseal bone cells of rats after high-dose treatment with corticosterone. *Bone*. 26(1):33-42.

Smits P, Li P, Mandel J, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, de Crombrughe B, Lefebvre V. **(2001)**. The transcription factors L-Sox5 and Sox6 are essential for cartilage formation. *Dev Cell*. 1(2):277-90.

Soranzo N, Rivadeneira F, Chinappan-Horsley U, Malkina I, Richards JB, Hammond N, Stolk L, Nica A, Inouye M, Hofman A, Stephens J, Wheeler E, Arp P, Gwilliam R, Jhamai PM, Potter S, Chaney A, Ghorji MJ, Ravindrarajah R, Ermakov S, Estrada K, Pols HA, Williams FM, McArdle WL, van Meurs JB, Loos RJ, Dermitzakis ET, Ahmadi KR, Hart DJ, Ouweland WH, Wareham NJ, Barroso I, Sandhu MS, Strachan DP, Livshits G, Spector TD, Uitterlinden AG, Deloukas P. **(2009)**. Meta-analysis of genome-wide scans for human adult stature identifies novel Loci and associations with measures of skeletal frame size. *PLoS Genet*. 5(4):e1000445.

Sovio U, Bennett AJ, Millwood IY, Molitor J, O'Reilly PF, Timpson NJ, Kaakinen M, Laitinen J, Haukka J, Pillas D, Tzoulaki I, Molitor J, Hoggart C, Coin LJ, Whittaker J, Pouta A, Hartikainen AL, Freimer NB, Widen E, Peltonen L, Elliott P, McCarthy MI, Jarvelin MR. **(2009)**. Genetic determinants of height growth assessed longitudinally from infancy to adulthood in the northern Finland birth cohort 1966. *PLoS Genet*. 5(3):e1000409.

Spranger J, Winterpacht A, Zabel B. **(1994)**. The type II collagenopathies: a spectrum of chondrodysplasias. *Eur J Pediatr*. 153(2):56-65.

St-Jacques B, Hammerschmidt M, McMahon AP. **(1999)**. Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Dev*. 15;13(16):2072-86.

Stanton H, Rogerson FM, East CJ, Golub SB, Lawlor KE, Meeker CT, Little CB, Last K, Farmer PJ, Campbell IK, Fourie AM, Fosang AJ. **(2005)**. ADAMTS5 is the major aggrecanase in mouse cartilage in vivo and in vitro. *Nature*. 31;434(7033):648-52.



Stevens DG, Boyer MI, Bowen CV. **(1999)**. Transplantation of epiphyseal plate allografts between animals of different ages. *J Pediatr Orthop*. 19(3):398-403.

Stuppia L, Calabrese G, Gatta V, Pintor S, Morizio E, Fantasia D, Guanciali Franchi P, Rinaldi MM, Scarano G, Concolino D, Giannotti A, Petreschi F, Anzellotti MT, Pomilio M, Chiarelli F, Tumini S, Palka G. **(2003)**. SHOX mutations detected by FISH and direct sequencing in patients with short stature. *J Med Genet*. 40(2):E11.

Suzuki S, Yoshimura M, Nakayama M, Mizuno Y, Harada E, Ito T, Nakamura S, Abe K, Yamamuro M, Sakamoto T, Saito Y, Nakao K, Yasue H, Ogawa H. **(2004)**. Plasma level of B-type natriuretic peptide as a prognostic marker after acute myocardial infarction: a long-term follow-up analysis. *Circulation*. 110(11):1387-91.

Svingen T, Tonissen KF. **(2006)**. Hox transcription factors and their elusive mammalian gene targets. *Heredity (Edinb)*. 97(2):88-96.

Thuault S, Valcourt U, Petersen M, Manfioletti G, Heldin CH, Moustakas A. **(2006)**. Transforming growth factor-beta employs HMGA2 to elicit epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol*. 17;174(2):175-83.

Trinklein ND, Aldred SF, Hartman SJ, Schroeder DI, Otilar RP, Myers RM. **(2004)**. An abundance of bidirectional promoters in the human genome. *Genome Res*. 14(1):62-6.

Toydemir RM, Brassington AE, Bayrak-Toydemir P, Krakowiak PA, Jorde LB, Whitby FG, Longo N, Viskochil DH, Carey JC, Bamshad MJ. **(2006)**. A novel mutation in FGFR3 causes camptodactyly, tall stature, and hearing loss (CATSHL) syndrome. *Am J Hum Genet*. 79(5):935-41.

Tsutsui K, Manabe R, Yamada T, Nakano I, Oguri Y, Keene DR, Sengle G, Sakai LY, Sekiguchi K. **(2010)**. ADAMTSL-6 is a novel extracellular matrix protein that binds to fibrillin-1 and promotes fibrillin-1 fibril formation. *J Biol Chem*. 12;285(7):4870-82.

Van de Laar IM, Oldenburg RA, Pals G, Roos-Hesselink JW, de Graaf BM, Verhagen JM, Hoedemaekers YM, Willemsen R, Severijnen LA, Venselaar H, Vriend G, Pattynama PM, Collée M, Majoor-Krakauer D, Poldermans D, Frohn-Mulder IM, Micha D, Timmermans J, Hilhorst-Hofstee Y, Bierma-Zeinstra SM, Willems PJ, Kros JM, Oei EH, Oostra BA, Wessels MW, Bertoli-Avella AM. **(2011)**. Mutations in SMAD3 cause a syndromic form of aortic aneurysms and dissections with early-onset osteoarthritis. *Nat Genet*. 43(2):121-6.

Van der Eerden BC, Karperien M, Wit JM. **(2003)**. Systemic and local regulation of the growth plate. *Endocr Rev*. 24(6):782-801.

Vega RB, Matsuda K, Oh J, Barbosa AC, Yang X, Meadows E, McAnally J, Pomajzl C, Shelton JM, Richardson JA, Karsenty G, Olson EN. **(2004)**. Histone deacetylase 4 controls chondrocyte hypertrophy during skeletogenesis. *Cell*. 119(4):555-66.

Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, Gocayne JD, Amanatides P, Ballew RM, Huson DH, Wortman JR, Zhang Q, Kodira CD, Zheng XH, Chen L, Skupski M, Subramanian G, Thomas PD, Zhang J, Gabor Miklos GL, Nelson C, Broder S, Clark AG, Nadeau J, McKusick VA, Zinder N, Levine AJ, Roberts RJ, Simon M, Slayman C, Hunkapiller M, Bolanos R, Delcher A, Dew I, Fasulo D, Flanigan M, Florea L, Halpern A, Hannenhalli S, Kravitz S, Levy S, Mobarry C, Reinert K, Remington K, Abu-Threideh J, Beasley E, Biddick K, Bonazzi V, Brandon R, Cargill M, Chandramouliswaran I, Charlab R, Chaturvedi K, Deng Z, Di

Francesco V, Dunn P, Eilbeck K, Evangelista C, Gabrielian AE, Gan W, Ge W, Gong F, Gu Z, Guan P, Heiman TJ, Higgins ME, Ji RR, Ke Z, Ketchum KA, Lai Z, Lei Y, Li Z, Li J, Liang Y, Lin X, Lu F, Merkulov GV, Milshina N, Moore HM, Naik AK, Narayan VA, Neelam B, Nusskern D, Rusch DB, Salzberg S, Shao W, Shue B, Sun J, Wang Z, Wang A, Wang X, Wang J, Wei M, Wides R, Xiao C, Yan C, Yao A, Ye J, Zhan M, Zhang W, Zhang H, Zhao Q, Zheng L, Zhong F, Zhong W, Zhu S, Zhao S, Gilbert D, Baumhueter S, Spier G, Carter C, Cravchik A, Woodage T, Ali F, An H, Awe A, Baldwin D, Baden H, Barnstead M, Barrow I, Beeson K, Busam D, Carver A, Center A, Cheng ML, Curry L, Danaher S, Davenport L, Desilets R, Dietz S, Dodson K, Doup L, Ferreira S, Garg N, Gluecksmann A, Hart B, Haynes J, Haynes C, Heiner C, Hladun S, Hostin D, Houck J, Howland T, Ibegwam C, Johnson J, Kalush F, Kline L, Koduru S, Love A, Mann F, May D, McCawley S, McIntosh T, McMullen I, Moy M, Moy L, Murphy B, Nelson K, Pfannkoch C, Pratts E, Puri V, Qureshi H, Reardon M, Rodriguez R, Rogers YH, Romblad D, Ruhfel B, Scott R, Sitter C, Smallwood M, Stewart E, Strong R, Suh E, Thomas R, Tint NN, Tse S, Vech C, Wang G, Wetter J, Williams S, Williams M, Windsor S, Winn-Deen E, Wolfe K, Zaveri J, Zaveri K, Abril JF, Guigó R, Campbell MJ, Sjolander KV, Karlak B, Kejariwal A, Mi H, Lazareva B, Hatton T, Narechania A, Diemer K, Muruganujan A, Guo N, Sato S, Bafna V, Istrail S, Lippert R, Schwartz R, Walenz B, Yooseph S, Allen D, Basu A, Baxendale J, Blick L, Caminha M, Carnes-Stine J, Caulk P, Chiang YH, Coyne M, Dahlke C, Mays A, Dombroski M, Donnelly M, Ely D, Esparham S, Fosler C, Gire H, Glanowski S, Glasser K, Glodek A, Gorokhov M, Graham K, Gropman B, Harris M, Heil J, Henderson S, Hoover J, Jennings D, Jordan C, Jordan J, Kasha J, Kagan L, Kraft C, Levitsky A, Lewis M, Liu X, Lopez J, Ma D, Majoros W, McDaniel J, Murphy S, Newman M, Nguyen T, Nguyen N, Nodell M, Pan S, Peck J, Peterson M, Rowe W, Sanders R, Scott J, Simpson M, Smith T, Sprague A, Stockwell T, Turner R, Venter E, Wang M, Wen M, Wu D, Wu M, Xia A, Zandieh A, Zhu X. **(2001)**. The sequence of the human genome. *Science*. 16;291(5507):1304-51.

Vortkamp A, Lee K, Lanske B, Segre GV, Kronenberg HM, Tabin CJ. **(1996)**. Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science*. 2;273(5275):613-22.

Wallis GA, Rash B, Sykes B, Bonaventure J, Maroteaux P, Zabel B, Wynne-Davies R, Grant ME, Boot-Handford RP. **(1996)**. Mutations within the gene encoding the alpha 1 (X) chain of type X collagen (COL10A1) cause metaphyseal chondrodysplasia type Schmid but not several other forms of metaphyseal chondrodysplasia. *J Med Genet*. 33(6):450-7.

Weedon MN, Lettre G, Freathy RM, Lindgren CM, Voight BF, Perry JR, Elliott KS, Hackett R, Guiducci C, Shields B, Zeggini E, Lango H, Lyssenko V, Timpson NJ, Burt NP, Rayner NW, Saxena R, Ardlie K, Tobias JH, Ness AR, Ring SM, Palmer CN, Morris AD, Peltonen L, Salomaa V; Diabetes Genetics Initiative; Wellcome Trust Case Control Consortium, Davey Smith G, Groop LC, Hattersley AT, McCarthy MI, Hirschhorn JN, Frayling TM. **(2007)**. A common variant of HMGA2 is associated with adult and childhood height in the general population. *Nat Genet*. 39(10):1245-50.

Weedon MN, Lango H, Lindgren CM, Wallace C, Evans DM, Mangino M, Freathy RM, Perry JR, Stevens S, Hall AS, Samani NJ, Shields B, Prokopenko I, Farrall M, Dominiczak A; Diabetes Genetics Initiative; Wellcome Trust Case Control Consortium, Johnson T, Bergmann S, Beckmann JS, Vollenweider P, Waterworth DM, Mooser V, Palmer CN, Morris AD, Ouwehand WH; Cambridge GEM Consortium, Zhao JH, Li S, Loos RJ, Barroso I, Deloukas P, Sandhu MS, Wheeler E, Soranzo N, Inouye M, Wareham NJ, Caulfield M, Munroe PB, Hattersley AT, McCarthy MI, Frayling TM. **(2008)**. Genome-wide association analysis identifies 20 loci that influence adult height. *Nat Genet*. 40(5):575-83.

- Weir EC, Philbrick WM, Amling M, Neff LA, Baron R, Broadus AE. **(1996)**. Targeted overexpression of parathyroid hormone-related peptide in chondrocytes causes chondrodysplasia and delayed endochondral bone formation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 17;93(19):10240-5.
- Weise M, De-Levi S, Barnes KM, Gafni RI, Abad V, Baron J. **(2001)**. Effects of estrogen on growth plate senescence and epiphyseal fusion. *Proc Natl Acad Sci USA*. 98(12):6871-6.
- Wilson DS, Guenther B, Desplan C, Kuriyan J. **(1995)**. High resolution crystal structure of a paired (Pax) class cooperative homeodomain dimer on DNA. *Cell*. 8;82(5):709-19.
- Wit JM, Kamp GA, Rikken B. **(1996)**. Spontaneous growth and response to growth hormone treatment in children with growth hormone deficiency and idiopathic short stature. *Pediatr Res*. 39(2):295-302.
- Wolffe AP. **(1994)**. Architectural transcription factors. *Science*. 20;264(5162):1100-1.
- Wright E, Hargrave MR, Christiansen J, Cooper L, Kun J, Evans T, Gangadharan U, Greenfield A, Koopman P. **(1995)**. The Sry-related gene Sox9 is expressed during chondrogenesis in mouse embryos. *Nat Genet*. 9(1):15-20.
- Wuelling M, Vortkamp A. **(2009)**. Transcriptional networks controlling chondrocyte proliferation and differentiation during endochondral ossification. *Pediatr Nephrol*. 25(4):625-31.
- Yang L, Ma X, Lyone A, Zou J, Blackburn ML, Pan J, Yang D, Matsushita H, Mei B, Zielinska-Kwiatkowska A, Chansky HA. **(2009)**. Proper expression of helix-loop-helix protein Id2 is important to chondrogenic differentiation of ATDC5 cells. *Biochem J*. 1;419(3):635-43.
- Yasoda A, Komatsu Y, Chusho H, Miyazawa T, Ozasa A, Miura M, Kurihara T, Rogi T, Tanaka S, Suda M, Tamura N, Ogawa Y, Nakao K. **(2004)**. Overexpression of CNP in chondrocytes rescues achondroplasia through a MAPK-dependent pathway. *Nat Med*. 10(1):80-6.
- Yoshida CA, Yamamoto H, Fujita T, Furuichi T, Ito K, Inoue K, Yamana K, Zanma A, Takada K, Ito Y, Komori T. **(2004)**. Runx2 and Runx3 are essential for chondrocyte maturation, and Runx2 regulates limb growth through induction of Indian hedgehog. *Genes Dev*. 15;18(8):952-63.
- Yu L, Liu H, Yan M, Yang J, Long F, Muneoka K, Chen Y. **(2007)**. Shox2 is required for chondrocyte proliferation and maturation in proximal limb skeleton. *Dev Biol*. 15;306(2):549-59.
- Zakany J, Duboule D. **(2007)**. The role of Hox genes during vertebrate limb development. *Curr Opin Genet Dev*. 17(4):359-66.
- Zhao Q, Eberspaecher H, Lefebvre V, De Crombrughe B. **(1997)**. Parallel expression of Sox9 and Col2a1 in cells undergoing chondrogenesis. *Dev Dyn*. 209(4):377-86.
- Zhou X, Benson KF, Ashar HR, Chada K. **(1995)**. Mutation responsible for the mouse pygmy phenotype in the developmentally regulated factor HMGI-C. *Nature*. 31;376(6543):771-4.
- Zhou G, Zheng Q, Engin F, Munivez E, Chen Y, Sebald E, Krakow D, Lee B. **(2006)**. Dominance of SOX9 function over RUNX2 during skeletogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 12;103(50):19004-9.

Zinn AR, Wei F, Zhang L, Elder FF, Scott CL Jr, Marttila P, Ross JR. **(2002)**. Complete SHOX deficiency causes Langer mesomelica deficiency. Am J Med Genet 110:158–163.

**ANEXOS**



## ANEXO I

**Anexo I: Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para la clonación de los fragmentos del intrón 3 de *ADAMTSL3*.** Las secuencias de las enzimas de restricción, necesarias para su posterior subclonación en el vector *pGL3 Promotor*, son GAGCTC para *SacI* y CTCGAG para *XhoI*, las colas añadidas a los extremos 5' de cada oligonucleótido dependen de la enzima de restricción, para *SacI* es ATACCG, mientras que para *XhoI* es GATCGG.

Nombre del clon	Enzimas de restricción		Oligonucleótido directo 5'-3'	Oligonucleótido reverso 5'-3'	Tamaño del producto (pb)
	Extremo 5'	Extremo 3'			
<i>pGL3Prom-ADAMTSL3-I3</i> (881-1542)	<i>SacI</i>	<i>XhoI</i>	GACAAACTAATCCTAATGTG	CCTTATACGCCACTCCAGATG	662
<i>pGL3Prom-ADAMTSL3-I3</i> (1041-1542)	<i>SacI</i>	<i>XhoI</i>	ATGTGATTGGAATTCTGGGG	CCTTATACGCCACTCCAGATG	502
<i>pGL3Prom-ADAMTSL3-I3</i> (969-1230)	<i>SacI</i>	<i>XhoI</i>	GACTTAGTCATGGGTGTCTAC	GTGCGATCATTGAAAGATTG	261
<i>pGL3Prom-ADAMTSL3-I3</i> (969-1167)	<i>SacI</i>	<i>XhoI</i>	GACTTAGTCATGGGTGTCTAC	CCTCTAGACCCACAACTTTC	198
<i>pGL3Prom-ADAMTSL3-I3</i> (969-1045)	<i>SacI</i>	<i>XhoI</i>	GACTTAGTCATGGGTGTCTAC	CACATTGAGAAGCTGTGACTCA	76
<i>pGL3Prom-ADAMTSL3-I3</i> (1040-1119)	<i>SacI</i>	<i>XhoI</i>	ATGTGATTGGAATTCTGGGG	CCACCCATGTAATGCACACAG	79
<i>pGL3Prom-ADAMTSL3-I3</i> (1113-1167)	<i>SacI</i>	<i>XhoI</i>	GGGTGGAATTTAATGTCAT	CCTCTAGACCCACAACTTTC	54
<i>pGL3Prom-ADAMTSL3-I3</i> (737-1060)	<i>SacI</i>	<i>XhoI</i>	CCCTCCGAAACAAAAATGAAC	CCCCAGAATTCCAATCACAT	323
<i>pGL3Prom-ADAMTSL3-(3'-5')-I3</i> (969-1167)	<i>XhoI</i>	<i>SacI</i>	GACTTAGTCATGGGTGTCTAC	CCTCTAGACCCACAACTTTC	198
<i>pGL3Prom-ADAMTSL3-(3'-5')-I3</i> (969-1045)	<i>XhoI</i>	<i>SacI</i>	GACTTAGTCATGGGTGTCTAC	CACATTGAGAAGCTGTGACTCA	76
<i>pGL3Prom-ADAMTSL3-(3'-5')-I3</i> (1040-1119)	<i>XhoI</i>	<i>SacI</i>	ATGTGATTGGAATTCTGGGG	CCACCCATGTAATGCACACAG	79
<i>pGL3Prom-ADAMTSL3-(3'-5')-I3</i> (1113-1167)	<i>XhoI</i>	<i>SacI</i>	GGGTGGAATTTAATGTCAT	CCTCTAGACCCACAACTTTC	54

## ANEXO II

**Anexo II: Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para la clonación de los fragmentos del intrón 1 de *HMGA2*.** Las secuencias de las enzimas de restricción, necesarias para su posterior subclonación en el vector *pGL3 Promotor*, son GAGCTC para *SacI* y CTCGAG para *XhoI*, las colas añadidas a los extremos 5' de cada oligonucleótido dependen de la enzima de restricción, para *SacI* es ATACCG, mientras que para *XhoI* es GATCGG.

Nombre del clon	Enzimas de restricción		Oligonucleótido directo 5'-3'	Oligonucleótido reverso 5'-3'	Tamaño del producto (pb)
	Extremo 5'	Extremo 3'			
<i>pGL3Basic-HMGA2-I1</i> (1308-1501)	<i>SacI</i>	<i>XhoI</i>	CTCCCGAATTCTCTAAATG	GCTCCTATGCCAAGTAGTAAA	193
<i>pGL3Basic-HMGA2-I1</i> (1308-1447)	<i>SacI</i>	<i>XhoI</i>	CTCCCGAATTCTCTAAATG	ATTCCAGATCCCAAATATTTATCC	139
<i>pGL3Basic-HMGA2-I1</i> (1374-1501)	<i>SacI</i>	<i>XhoI</i>	GTCTCACTTAATCACCGAATC	GCTCCTATGCCAAGTAGTAAA	127
<i>pGL3Basic-HMGA2-I1</i> (1374-1449)	<i>SacI</i>	<i>XhoI</i>	GTCTCACTTAATCACCGAATC	ATATTCCAGATCCCAAATATTTATC	75
<i>pGL3Basic-HMGA2-I1</i> (1347-1387)	<i>SacI</i>	<i>XhoI</i>	GGACGTTTCATGGGTTTTAAG	GATTAAGTGAGACTAATTAA	40
<i>pGL3Basic-HMGA2-I1</i> (1437-1478)	<i>SacI</i>	<i>XhoI</i>	GATCTGGAATATTAATCATC	CTCAAGTGGTTAAGAGAATGC	41
<i>pGL3Basic-HMGA2-(3'-5')-I1</i> (1308-1447)	<i>XhoI</i>	<i>SacI</i>	CTCCCGAATTCTCTAAATG	ATTCCAGATCCCAAATATTTATCC	244
<i>pGL3Basic-HMGA2-(3'-5')-I1</i> (1374-1501)	<i>XhoI</i>	<i>SacI</i>	GTCTCACTTAATCACCGAATC	GCTCCTATGCCAAGTAGTAAA	127
<i>pGL3Basic-HMGA2-(3'-5')-I1</i> (1374-1449)	<i>XhoI</i>	<i>SacI</i>	GTCTCACTTAATCACCGAATC	ATATTCCAGATCCCAAATATTTATC	75
<i>pGL3Basic-HMGA2-(3'-5')-I1</i> (1347-1387)	<i>XhoI</i>	<i>SacI</i>	GGACGTTTCATGGGTTTTAAG	GATTAAGTGAGACTAATTAA	40
<i>pGL3Basic-HMGA2-(3'-5')-I1</i> (1437-1478)	<i>XhoI</i>	<i>SacI</i>	GATCTGGAATATTAATCATC	CTCAAGTGGTTAAGAGAATGC	41



## ANEXO III

**Anexo III: Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de cada exón de *ADAMTSL3*.** El tamaño del producto amplificado y la temperatura de anillamiento de cada amplicón también se indican en la tabla. (\*) Para el exón 8 las condiciones de PCR son: 1x PCR Buffer (Qiagen), 1U de HotStartTaq (Qiagen), 0.2 mM de dNTPs (Roche) y 0.4  $\mu$ M de cada oligonucleótido, todo ello en un volumen final de 25  $\mu$ l; con 15 min de activación a 95°C. (\*\*) Para los exones 9 y 13 son 38 ciclos de PCR. (\*\*\*) Para los exones 6 y 22 las condiciones de PCR son un touchdown, con 16 ciclos para disminuir la temperatura 8 grados (0,5 °C por ciclo) desde 66°C ó 72°C respectivamente y 25 ó 30 ciclos más respectivamente a la temperatura inferior. (2) Para llevar a cabo la técnica de HRM se diseñaron nuevos oligonucleótidos para los exones 18 y 22.

Exón de <i>ADAMTSL3</i>	Oligonucleótido directo 5'-3'	Oligonucleótido reverso 5'-3'	Tamaño (pb)	Temperatura de anillamiento (°C)
2	CGCTTAAGTCACGGTTTACTGCC	CTACTCAGGATTCAGAGAGGACC	383	53
3	GCCTTCTTGGACTTTACCTG	AGGGTGTC AAGGGTCTGTTGTA	325	53
4	CCTGGGCAATAAGATCGAAG	TTAGACAAAGCAAACGTTACAC	403	53
5	AATGCTTGCCTCTTCTATGAA	AAGTTTTCCACAAAGGGTATT	220	53
6***	TCCTGAAATGAAGAGAGCTCCC	AAAGTATAAATGGTCAATAGATACA	556	66-58
7	TCCTGAAATGAAGAGAGCTCCC	GCATTGGCAAAGGTTCAAAG	414	53
8*	GCAGACTGACAGCTCACACG	GCCTTCTTCTCTCAACTCG	330	48
9**	GTGGCTATTTTGACATTG	AAGATGGAAATATTGATGACAC	412	53
10	TGACTCCAGGGAGATTTGCAGA	AGGCTGCTGAGTAAGGTG	468	53
11	AGTGTGTGGCAAGTGATAACTC	AAAGCCAAAAGATGATAATG	580	53
12	TGTCTCTTGGGATGTCAAA	TCAGAGTCAGGAAGGACCATAC	473	53

13**	TTCAGCTGAACCACAATTGATA	CCTCGTCCTCCAAGTGTG	474	58
14	CCTCTGTACCCTTCCTTACAT	TGAAAGGGAAATGCTACAATA	378	53
15	TTCCAGCAGCCACCTAATGTAT	GGTCAAATCACATGCGTTAAA	545	53
16	AATGTGTGGAATTCCACCGAGTGA	CTAATTTGCATATTTGGCTTACC	506	53
17	CTGCAGCCCTATGATAGTCA	CTGAAGCAGGCTTAGCACATCTAC	378	53
18-19	AGAGGAGAGCTTCACGTTGTTTCAT	GCCTGGACTACGGAAGTTC	754	53
18 (2)	GCACGTTGGTTTATTGGACT	GCTTGGCCCACTCTATGTTA	329	57
20	GGCTTTCTTCTTGGCACATCCGTA	GGTCTTCCACGTTCTACTGATCGC	442	53
21A	AAAAAGATACGTTTGTAGCCTGT	TCATTTGTGCCATGTGACTCC	568	53
21B	ATCACCAAGTCAGGCTCACTAAAA	CTGTGCCTTGGCTAATTCG	516	53
21C	CGGAGAGGTCAGCGATGATCT	GGAATAGCCATTAAGAAGGTAGTGC	447	53
22***	GCCAGCCCAAAGCCTGTAATGGTG	GAGCTTACAGTGAGCCGAGATCACG	384	72-64
22 (2)	CTGTAGCCCTAGGTCAGTTA	ATTTCAACAGTGGGCATTAC	209	48
23	TTCATCCATCTGTCCGTATGTCCAC	TCAGGCTGAGGTCTCGAATACCA	441	53
24	TAAACCCATATGCTGACTTACGGTC	AGGGTGTTAGAATTTAGTGCTCGTT	457	53
25	GAACACCCAAGCTGGACCAATAA	TTGAACCACTAAAGACTGAGGGTCAAGA	347	53
26	CTTCTCCAGCTCGTCGTCAT	CACTTAGCAGGATGCCTAGTATACA	382	53
27	GGCATACCAGTCCTTACTAAAGTC	TAAACCTTGAGGTCAAAGACATACA	396	53
28	CCCTTGTAATAGGTCTTCAGCTATC	ATTCCATTTTCAGGCAGTTATAATC	283	53
29	AAAGTTACACCCTGCCTCTCCTATT	CCCCTGATGTCCCAAGCTAC	435	53
30	CTCACTCTGTGATCTCAATTTATGGCT	CTTAACAGTGGTGTTTTGCATCAACCT	358	53

## **ANEXO IV**

**Anexo IV: Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de cada exón de *HMGA2*.** El tamaño del producto amplificado y la temperatura de anillamiento de cada amplicón también se indican en la tabla. (\*) Para el exón 1 la mezcla de PCR contiene un 5% de DMSO.

Exón de <i>HMGA2</i>	Oligonucleótido directo 5'-3'	Oligonucleótido reverso 5'-3'	Tamaño (pb)	Temperatura de anillamiento (°C)
1*	GCCCTATCACCTCATCTCCCGAAAG	GCCGTGCACAATAGCGAAAGTCCG	490	64.8
2	TTCTTTCAGACATTCTTGCCACA	AAAAGGTAACTCGCATCTAACTAA	302	53
3	GGCGAGGGGTTGCATAGATAC	GTTGGAAATTCATGTAATCGACGAA	391	53
4	GCCCAGCCTGGTCTAC	GGAGGTTTTCATGGTACG	473	53
5	GCCAGTCATCGTCATCCT	GGCAATACAGAATAAGTGGT	268	53

## ANEXO V

**Anexo V: Sondas de MLPA diseñado para detectar deleciones y duplicaciones en el gen *ADAMTSL3*.** Las sondas están ordenadas por orden creciente de tamaño. Las sondas control están marcadas en gris más oscuro. Las sondas derechas están fosforiladas en su extremo 5'. Para alcanzar el tamaño final, la secuencia hibridante de las sondas se completa con colas al azar y con la secuencia universal de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de las sondas (izquierda: 5'-GGGTTCCCTAAGGGTTGGA-3'; derecha: 5'-TCTAGATTGGATCTTGCTG GCAC-3').

Nombre sonda	Locus	Secuencia hibridante izquierda (5'-3')	Secuencia hibridante derecha (5'-3')	Tamaño total sonda (pb)
WBSR1	7q11.23	GGTAGCTCTCGAGAATCTAGAGGTGG	ATGGGATTCCCGGGATGACTTC	89
<i>ADAMTSL3</i> -Exon7	15q25.2	CAGGCTTGTACGGGGACAATCAAA	GTCACACGTTTCTCCTGAAAAAAGTAGG	94
<i>ADAMTSL3</i> -Exon2	15q25.2	CTACAACTGAGACCCGGAGGAG	ACTAGACCCCATGGCTTCCTGG	99
<i>ADAMTSL3</i> -Exon9	15q25.2	GGGCTCCGAGAGGCAAACCTT	TAAGATTCCAGGACCTCTGATGGCTG	104
<i>ADAMTSL3</i> -Exon14	15q25.2	GTATTAACCACCGCGGAGAGC	ATGTTGGGGGCTGCAATCCACAAC	108
RAI1	17p11	GGCAAGGAAAAGTGGCCTTTTGC GTGACA	CAGAAGTGGACACATCATTCTGATCTCAGGGCTCT	112
<i>ADAMTSL3</i> -Exon17	15q25.2	GAAGCCATAGCAGTGTGCTTACATATCC	AGACCCAGCAGACAGTCAATGACAG	117
<i>ADAMTSL3</i> -Exon21	15q25.2	GTGGCCGAATTAGCCAAGGCA	CAGCCAACACACATGCAGTGG	122
MAPT	17q21.31	CCTGGGACTTTAGGGCTAACCAGTTCTCTTGTA	AGGACTTGTGCCTCTTGGGAGACGTCCACCCGTTTC	128
<i>ADAMTSL3</i> -Exon23	15q25.2	CGTGACAATCCGATGTCCTGTAAAAG	GTAAGTGTGGTCATTTAGTGGGAGG	133
<i>ADAMTSL3</i> -Exon27	15q25.2	GTGCTCTGTGCTTGCGGTGAA	GGATACCACAGTCGGCAGGTGAC	138
<i>ADAMTSL3</i> -5'	15q25.2	GATGCCTCCTCTAGGTACCCATATCAGT	GAATGACACTGAGCTGCTCATTT	143
<i>ADAMTSL3</i> -3'	15q25.2	GGAATGAAAGACCGACAGTGCAC	CTGCTTGGATAGTAAGCACGTGACC	148

## **ANEXO VI**

**Anexo VI: Sondas de MLPA diseñado para detectar deleciones y duplicaciones en el gen *HMGA2*.** Las sondas están ordenadas por orden creciente de tamaño. Las sondas control están marcadas en gris más oscuro. Las sondas derechas están fosforiladas en su extremo 5'. Para alcanzar el tamaño final, la secuencia hibridante de las sondas se completa con colas al azar y con la secuencia universal de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de las sondas (izquierda: 5'-GGGTTCCCTAAGGGTTGGA-3'; derecha: 5'-TCTAGATTGGATCTTGCTG GCAC-3').

Nombre sonda	Locus	Secuencia hibridante izquierda (5'-3')	Secuencia hibridante derecha (5'-3')	Tamaño total sonda (pb)
WBSCR1	7q11.23	GGTAGCTCTCGAGAATCTAGAGGTGG	ATGGGATTCCCGGGATGACTTC	89
<i>HMGA2</i> -Exón 2	12q14.3	GACCCAAAGGCAGCAAAAACAAGAG	TCCCTCTAAAGCAGCTCAAAAG	94
<i>HMGA2</i> -5'	12q14.3	CTAAGCGTTCCAGACCCACGA	GAAACCCTGGGTTCCTGCAGAG	100
<i>HMGA2</i> -Exón 3	12q14.3	GCAGAAAGCAGAAGCCACTGGA	GAAAAACGGCCAAGAGGCAGAC	106
RAI1	17p11	GGCAAGGAAAAGTGGCCTTTTGC GTGACA	CAGAAGTGGACACATCATTCTGATCTCAGGGCTCT	112
<i>HMGA2</i> -Exón 4	12q14.3	CCTCCTTAGCCACAACAAGTTGTTC	GAAGAAGCCTGCTCAGGTAAGACATAGTC	118
MAPT	17q21.31	CCTGGGACTTTAGGGCTAACCAGTTCTCTTGTA	AGGACTTGTGCCTCTTGGGAGACGTCCACCCGTTTC	128
<i>HMGA2</i> -Exón 5	12q14.3	GCTGTGCCCTTTGTGTGTTCCAGGAGGA	AACTGAAGAGACATCCTCACAAGAGTCTGC	134
<i>HMGA2</i> -3'	12q14.3	GAGAATGCTGCACTGCCAGAACCCA	GACTGTGGGGTATCCACCTTGAAAG	140



## **ANEXO VII**

**Durante la realización de la presente Tesis Doctoral, la doctoranda ha participado en las siguientes publicaciones:**

### **Aza-Carmona et al, 2013**

Aza-Carmona M, Barca-Tierno V, Hisado-Oliva A, **Belinchón A**, Gorbenko-del Blando D, Rodríguez JI, Benito Sanz S, Campos Barros A, Heath KE. **(2013)**. NPPB and ACAN, two novel SHOX2 transcription targets implicated in skeletal development. Plos One. En prensa.

### **Aza-Carmona et al, 2011**

Aza-Carmona M, Shears DJ, Yuste-Checa P, Barca-Tierno V, Hisado-Oliva A, **Belinchón A**, Benito-Sanz S, Rodríguez JI, Ricardo R, Argente J, Campos-Barros A, Scambler PJ, Heath KE. **(2011)**. SHOX interacts with the chondrogenic transcription factors SOX5 and SOX6 to activate the aggrecan enhancer. Hum Mol Genet. 15;20(8):1547-59.

### **Barroso et al, 2010**

Barroso E, Benito-Sanz S, **Belinchón A**, Yuste-Checa P, Gracia R, Aragonés A, Campos-Barros A, Heath KE. **(2010)**. Identification of the first de novo PAR1 deletion downstream of SHOX in an individual diagnosed with Léri-Weill dyschondrosteosis (LWD). Eur J Med Genet. 53(4):204-7.





***NPPB* and *ACAN*, two novel *SHOX2* transcription targets implicated in  
skeletal development**

Miriam Aza-Carmona<sup>1,2,Ψ,\*</sup>, Veronica Barca-Tierno<sup>1,2\*</sup>, Alfonso Hisado-Oliva<sup>1,2</sup>, Alberta Belinchón<sup>1,2</sup>, Darya Gorbenko-del Blanco<sup>3</sup>, Jose Ignacio Rodriguez<sup>4</sup>, Sara Benito-Sanz<sup>1,2</sup>, Angel Campos-Barros<sup>1,2</sup>, Karen E. Heath<sup>1,2†</sup>.

1. Institute of Medical and Molecular Genetics (INGEMM), Hospital Universitario La Paz, Universidad Autónoma de Madrid, IdiPAZ, Madrid, Spain
2. Centro de Investigación Biomédica en Enfermedades Raras (CIBERER), Instituto Carlos III, Madrid, Spain
3. Dept. Celular Biology, Immunology & Neurosciences, Facultad de Medicina, Universidad de Barcelona, Barcelona, Spain
4. Department of Pathology, Hospital Universitario La Paz, Madrid.

\*Joint authorship, <sup>Ψ</sup> Current address: Dept. of Genetics & Microbiology, Universidad Autónoma de Barcelona, Spain. <sup>†</sup>Corresponding author: Instituto de Genética Médica y Molecular (INGEMM), Hospital Universitario La Paz, Pº Castellana 261, 28046 Madrid, Spain. Tel +34 91 207 1010 Ext.269, Fax +34 91 207 1040. E-mail: [karen.heath@salud.madrid.org](mailto:karen.heath@salud.madrid.org)

## ABSTRACT

SHOX and SHOX2 transcription factors are highly homologous, with even identical homeodomains. Genetic alterations in *SHOX* result in two skeletal dysplasias; Léri-Weill dyschondrosteosis (LWD) and Langer mesomelic dysplasia (LMD), while no human genetic disease has been linked to date with *SHOX2*. SHOX2 is, though, involved in skeletal development, as shown by different knockout mice models. Due to the high homology between SHOX and SHOX2, and their functional redundancy during heart development, we postulated that SHOX2 might have the same transcriptional targets and cofactors as SHOX in limb development. We selected two SHOX transcription targets regulated by different mechanisms: 1) the natriuretic peptide precursor B gene (*NPPB*) involved in the endochondral ossification signalling and directly activated by SHOX; and 2) Aggrecan (*ACAN*), a major component of cartilage extracellular matrix, regulated by the cooperation of SHOX with the SOX trio (SOX5, SOX6 and SOX9) via the protein interaction between SOX5/SOX6 and SHOX. Using the luciferase assay we have demonstrated that SHOX2, like SHOX, regulates *NPPB* directly whilst activates *ACAN* via its cooperation with the SOX trio. Subsequently, we have identified and characterized the protein domains implicated in the SHOX2 dimerization and also its protein interaction with SOX5/SOX6 and SHOX using the yeast-two hybrid and co-immunoprecipitation assays. Immunohistochemistry of human fetal growth plates from different time points demonstrated that SHOX2 is coexpressed with SHOX and the members of the SOX trio. Despite these findings, no mutation was identified in *SHOX2* in a cohort of 83 LWD patients with no known molecular defect, suggesting that *SHOX2* alterations do not cause LWD. In conclusion, our work has identified the first cofactors and two new transcription targets of SHOX2 in limb development, and we hypothesize a time- and tissue-specific functional redundancy between SHOX and SHOX2.

## INTRODUCTION

Alterations of *SHOX* and its enhancers have been reported in two skeletal dysplasias: Léri-Weill dyschondrosteosis (LWD, MIM 127300) and Langer mesomelic dysplasia (LMD, MIM 249700) as well as in a small proportion of individuals with idiopathic short stature (MIM 300582)[1-9]. Heterozygous mutations in *SHOX* or its enhancers results in LWD, a disproportionate short stature syndrome due to mesomelic shortening of the limbs, and the typical abnormality of the forearms known as Madelung deformity, characterized by the bowing of the radius and dorsal dislocation of the distal ulna. LMD is due to homozygous or compound heterozygous mutations in *SHOX* or its enhancers, resulting in severely disproportionate short stature with marked mesomelic and rhizomelic limb shortening. The estimated prevalence of *SHOX* haploinsufficiency is 1 in 1000 individuals [10].

The clinical symptoms produced by *SHOX* alterations, reflect its molecular function and also its expression pattern during limb development. *SHOX* belongs to the paired-related homeodomain family of transcription factors [11]. Two major *SHOX* isoforms exist, *SHOXa* and *SHOXb* [1], both containing a homeodomain (HD), but only *SHOXa* (which from now will be called in this paper *SHOX*) acts as a transcriptional activator in osteogenic cells via its transactivation domain, the OAR (Otp, Aristaless, Rax), which is absent in *SHOXb*. *SHOX* has been shown to regulate various genes involved in limb development: directly regulating the transcription of the natriuretic peptide precursor B gene (*NPPB*, MIM 600295) [12] which encodes the brain natriuretic protein (BNP), and fibroblast growth factor receptor 3 gene (*FGFR3*, MIM 134934) [13], two genes involved in the signalling of endochondral ossification. In contrast, *SHOX* cooperates with the SOX trio, via its protein interaction with SOX5/SOX6, to regulate the Aggrecan gene (*ACAN*, MIM 155760) which encodes a major component of cartilage extracellular matrix [14]. Recently, the homeobox transcription factor

HOXA9, which is thought to be important in limb patterning [15], has been identified as the first regulator of *SHOX* expression [16].

During limb development, *SHOX* is principally expressed in the mesomelic portions of the limbs [17, 18], in the mesenchymal cells during the first steps of chondrogenesis [17, 18] and in the developing chondrocytes of the human growth plate throughout endochondral ossification [14, 19].

*SHOX2* is the human paralog of *SHOX*, presenting a global homology of 83% and identical homeodomains [11]. Two *SHOX2* isoforms exist, *SHOX2a* (which we call *SHOX2* from now onwards) and *SHOX2b*, which differ only in their N-terminal regions [11]. However, the functional significance of these isoforms remains elusive.

Whilst no ortholog for *SHOX* exists in mice, an ortholog of *SHOX2* does exist [17]. The first *Shox2* knockout mouse was embryonically lethal, but it revealed the importance of this gene in palatogenesis and heart and limb development [20]. Subsequent analyses of different *Shox2* knockout mice and in xenopus showed that *Shox2* participates in an intricate signalling pathway that regulates the sinoatrial node formation and pacemaking function [21-24].

Different conditional *Shox2* knockout mice models have showed severe rhizomelic limb but also mesomelic hindlimb shortening [20, 25, 26], due to precocious chondrocyte maturation and hypertrophy [26, 27]. *Shox2* prevents the onset of early chondrocyte differentiation and the transition from mature to hypertrophic chondrocytes, regulating the expression, among others, of *Bmp2*, *Bmp4*, *Runx2* and *Runx3* [26, 27].

We set out to determine whether *SHOX2* could regulate the same transcription targets and interact both with *SHOX* and its cofactors, *SOX5* and *SOX6*, during limb development as: 1) *SHOX* and *SHOX2* are highly homologous; 2) both are expressed in the developing limbs, even overlapping in some regions [17, 18]; 3) they possess similar transcriptional

activities [22]; and 4) functional redundancy between these proteins has been demonstrated in the regulation of sinoatrial node formation and pacemaking function [28].

Using luciferase reporter assays, we show that SHOX2, like SHOX, has the capacity to activate directly *NPPB* whilst requiring the SOX trio to activate *ACAN*. Moreover, using yeast two-hybrid assays and co-immunoprecipitation we have characterized the domains implicated in the dimerization of SHOX2 and its interaction with SHOX, SOX5 and SOX6. Immunohistochemistry of human fetal growth plates demonstrated that SHOX2 is coexpressed with SOX5, SOX6, SOX9 and SHOX. Taken together, our work has identified the first cofactors and two new transcription targets of SHOX2 in limb development.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Generation of recombinant constructs**

The full-length cDNA of *SHOX2a* (NM\_006884.3) and *SHOX2b* (NM\_003030.4) and various *SHOX2a* fragments were amplified using appropriate oligonucleotides (Table S1), cloned using the TA-cloning kit (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and then subcloned into different plasmids. The *SHOX2a* missense mutations and various *SHOX2a* fragments were created using the QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (GE Healthcare, Fairfield, Co, USA), appropriate mutagenic oligonucleotides and different plasmids as templates (Table S2). The SHOX, SOX5, SOX6 and SOX9 clones were as previously described (14).

The *NPPB* 1030 bp promoter was amplified using oligos and PCR conditions as previously described [12], cloned into the pCR2.1 vector (Invitrogen) and then subcloned into pGL3-Basic luciferase vector (Promega, Madison, WI, USA). The *Acan* enhancer plasmid (4XA1)pCol2Luc [29] was kindly donated by Dr Veronique Lefebvre.

## **Cell culture**

Human osteosarcoma (U2OS, ATCC HTB-96) and human embryonic kidney 293 cells (HEK293, ATCC CRL-1573) were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen Gibco BRL), supplemented with 10% fetal bovine serum (Invitrogen Gibco BRL) and 1% penicillin and streptomycin (Invitrogen Gibco BRL). Cells were cultured at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>.

## **Luciferase assay**

Luciferase assays were performed with U2OS cells as previously described (14). Basically, cells were transfected using FuGene (Roche Applied Bioscience, Switzerland) at a DNA:Fugene ratio of 2:1 with different combinations of SHOX, SHOX2, SOX5/SOX6 and SOX9 expression plasmids and reporter vectors. In the case of *NPPB* reporter assays, 200 ng pRL-TK, 1500ng reporter plasmid and 250 ng expression plasmids was employed whilst, in the *Acan* reporter assays, 1.5 ng pRL-SV40, 750 ng reporter vector and 125 ng expression plasmids were added. Samples were normalized, firstly, with respect to the Renilla luciferase activity and then to that transfected with the empty reporter plasmid. Each combination was transfected three times, and three biological replicates were analyzed. Statistical analyses were undertaken with SPSS v15.0 for Windows. We employed one-factor analysis of variance (ANOVA) with the Bonferroni post hoc test for analysing the results of luciferase assay.

## **Yeast two-hybrid assay**

The yeast two-hybrid assay was undertaken as previously described [14]. All values represent the mean and standard deviation of five independent transformation experiments, each performed in triplicate.

### **Co-immunoprecipitation and Western blot analysis**

Immunoprecipitations were carried out in HEK293 cells as previously described [14]. Western blot analyses were undertaken using the following rabbit polyclonal antibodies: anti-SHOX (30) at a dilution of 1:3000, anti-SHOX2 (SAB2102137, Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) at a dilution of 1:1000, anti-SOX5 (Ab26041, Abcam, Cambridge, UK) and SOX6 (Sc-20092, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) at a dilution 1:2000. No cross reactivity was observed between SHOX2 and SHOX (Fig. S1).

### **Immunohistochemistry**

Human tibia growth plate sections were obtained from spontaneously aborted normal fetuses of 18, 27, 32 and 38 weeks, after obtaining ethical approval from the “Hospital Universitario La Paz Ethical committee for Clinical research” and written informed consent from the parents. The detailed immunohistochemical procedure was as previously described [14]. Negative controls (Fig. S1) were performed by: 1) replacing the primary antibody with PBS, 2) using a rabbit polyclonal IgG isotype control (Ab27472, Abcam) at a dilution of 1:50, 3) incubating sections of normal adult colon (where SHOX2 protein is not expected to be expressed) with the SHOX2 antibody. Specificity of the employed SHOX, SOX5, SOX6 and SOX9 antibodies had been previously demonstrated [14].

### ***SHOX2* mutation screening**

Ethical approval was obtained from the “Hospital Universitario La Paz Ethical committee for Clinical research”. All participants or parents of minors provided written informed consent for the performed studies. The cohort consisted of 83 probands with LWD or suspected LWD. Clinical details were obtained for all patients recruited into the study. Whenever possible, these included birth details, anthropometric measurement, actual height

and height standard deviation scores according to national standards [31], physical examination of extremities, and X-rays of the lower arm. Family histories were also documented, including parental heights. In all cases, the presence alterations in *SHOX* or its enhancers had been previously excluded [4, 7-9, 32, 33]. The control cohort consisted of 95 Spanish individuals with normal heights (Spanish DNA Bank, University of Salamanca).

Peripheral blood was drawn from probands for DNA extraction. Genomic DNA was isolated by the salt precipitation method (34). The screening of point mutations, small deletions and insertions in the coding sequences and intron/exon boundaries of *SHOX2* (NM\_006884.3) was performed using High Resolution Melting. DNA fragments were amplified using MegaMix-Gold (Microzone, Southampton, UK) and LC Green Plus + fluorescent dye (BioFire Diagnostics, Salt Lake City, UT, USA). PCR conditions are available in Table S3. Melting curves of amplified samples were analyzed using LightScanner HR96 (BioFire Diagnostics). Subsequent sequencing of any sample with abnormal melting profiles was carried out using the BigDye Terminator V3.1 kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

*SHOX2* deletions and duplications were studied using microsatellite markers or a self-designed MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification) assay. Microsatellite analysis was undertaken through the detection of heterozygosity at four different markers flanking *SHOX2* (Table S4). PCR conditions were as previously described (4). The self-designed MLPA assay consisted of five *SHOX2* probes and three control fragments (Table S5). MLPA reactions were carried out using EK1 SALSA MLPA Kit (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands) according to the manufacturer's protocol. The ratios of the test's peak areas versus control's samples were determined subsequently. Normal peaks were classified as showing a ratio of 0.65-1.35 whilst deletions and duplications were classified as having a ratio <0.65 or >1.35, respectively.



## RESULTS

### SHOX2 activates *NPPB* and *ACAN*

We firstly analyzed the ability of SHOX2 to activate *NPPB*, a direct SHOX target (12), using a luciferase assay in U2OS cells. Cells overexpressing SHOX2 were cotransfected with a luciferase reporter plasmid carrying the *NPPB* promoter. SHOX2 was able to activate *NPPB* expression to an even greater degree than that observed for SHOX (Fig. 1A). With the purpose of confirming the SHOX2 activation, we included two SHOX2 mutants which mimic SHOX mutants reported in LWD patients (SHOX mutation database, [www.hd-lovd.uni-hd.de](http://www.hd-lovd.uni-hd.de)): p.L155V that mimics the SHOX homeodomain p.L132V mutation, and p.Q234X, homolog to the SHOX p.Q211X mutation in which the OAR domain is absent. Both SHOX2 mutants failed to activate the *NPPB* promoter (Fig 1A).

We subsequently set out to determine if SHOX2 was also able to activate the *Acan* enhancer via the SOX trio. Luciferase assays were undertaken using combinations of SHOX2, SOX5, SOX6 and SOX9. Due to the mutual redundancy of SOX5 and SOX6 [35] these proteins were included independently in the assays. As with SHOX, SHOX2 was able to activate *Acan* enhancer transactivation in cooperation with SOX6/SOX9 (Fig. 1B) and SOX5/SOX9 (Fig S2), but not directly (Fig. 1B and Fig. S2). The two SHOX2 mutants, p.L155V and p.Q234X, reduced *Acan* enhancer activation (Fig. 1B and S2), as observed with their SHOX homologues [14].

### SHOX2 isoforms dimerize

Given that cooperative dimerization of paired-related homeodomains to DNA increases the transactivation efficiency to higher levels [36] and that SHOX preferentially binds to DNA

as dimers [30], we assumed that SHOX2 should also dimerize to transactivate its target genes. Using the yeast two-hybrid assay, we verified that the SHOX2a and SHOX2b isoforms are capable of homo- and hetero-dimerization (Fig. 2A).

Using a series of SHOX2 deletion constructs (Fig. 2B) and the yeast two-hybrid assay, we observed that only the SHOX2(139-331) construct containing the homeodomain and the OAR domain clearly interacted with SHOX2 (Fig. 2B), whilst weaker interactions were observed for the constructs that contained only one of these two domains.

Subsequently, we analyzed the interaction capacity of wild-type SHOX2 with seven artificially designed SHOX2 missense mutations (Fig. 2C) that mimic SHOX mutations identified in LWD patients (SHOX mutation database, [www.hd-lovd.uni-hd.de](http://www.hd-lovd.uni-hd.de)). Two homeodomain mutants (p.L155V and p.A193P) together with the OAR mutant p.R319P diminished their interaction capacity with SHOX2 (Fig. 2C). Interestingly, the SHOX2 p.R196C homeodomain mutant heterodimerizes with SHOX2 at similar levels to that of the wild-type (Fig. 2C), mimicking to that what was observed for its SHOX homologue, p.R173C [14, 37].

Thus, these experiments showed that both the homeodomain and the OAR are the domains implicated in the SHOX2 dimerization.

### **SHOX2 interacts with SOX5 and SOX6**

Previously we had demonstrated that SHOX interacts with SOX5/SOX6 to activate the *Acan* enhancer in combination with SOX9 [14], thus, we proposed that as SHOX2 also increases *Acan* expression, it could interact with the SOX trio in a similar manner. The yeast two-hybrid assay showed that SHOX2 interacts strongly with SOX6 whilst very weakly with SOX5 (Fig. 3A). Co-immunoprecipitation in HEK293 cells clearly demonstrated that SHOX2 interacts with both SOX5 and SOX6 (Fig. 3B).

Given that SOX5 and SOX6 are highly homologous, with an overall homology of 67% and 90% identity in their HMG and coiled-coil domains [38], we decided to characterize only the SHOX2-SOX6 interaction using the yeast two-hybrid assay and a series of SHOX2 deletion constructs (Fig. 3C), SHOX2 missense mutations (Fig. 3D) and SOX6 deletion constructs (Fig. 3E). The three SHOX2 deletion constructs that were able to interact with SOX6, SHOX2(1-200), SHOX2(139-200) and SHOX2(139-331), share the homeodomain (Fig. 3C). The assay with various SHOX2 missense mutations confirmed that the homeodomain is involved in the SHOX2-SOX6 interaction since all the homeodomain mutants (p.L155V, p.A193P and p.R196C) diminished their interaction ability (Fig. 3D). Moreover, the p.K139E mutant, located in the amino acid adjacent to the homeodomain, also reduced its interaction capacity with SOX6 (Fig. 3D), suggesting that this amino acid is important for the interaction, as observed for its SHOX homologue p.K116E, which had a reduced interaction with SOX6 [14]. Although the SOX6(479-787) construct containing the HMG domain alone is able to interact with SHOX2 (Fig. 3E), the fact that the SOX6(263-787) construct containing both the HMG and the second coiled-coil domain interacts with SHOX2 at a greater strength than the SOX6 full protein, suggests that the second coiled-coil may confer structural stability to the HMG domain.

Therefore, the SHOX2 homeodomain and the SOX6 HMG domain are involved in the SHOX2-SOX6 interaction.

### **SHOX2 interacts with SHOX**

Due to the high homology and the overlapping expression pattern in limb development of SHOX and SHOX2, we set out to determine if they could interact between each other. Using the yeast two hybrid assay we identified that the two SHOX2 isoforms could interact with SHOX *in vivo* (Fig. 4A). We confirmed the SHOX2a-SHOX interaction by co-

immunoprecipitation of HEK293 nuclear lysates overexpressing SHOX2a and SHOX (Fig. 4B).

Subsequently, we determined the domains implicated in this interaction employing deletion constructs (Fig. 4C-D) and SHOX missense mutations (Fig. 4E) in the yeast two hybrid assay. Only the SHOX2(139-331) construct containing the homeodomain and the C-terminal region including the OAR domain clearly interacted with SHOX (Fig. 4C), suggesting that both SHOX2 regions are required for the interaction with SHOX.

Among the different SHOX fragments examined, the SHOX(1-211), SHOX(117-274), SHOX(117-292) and SHOX(178-292) constructs were able to interact with SHOX2 (Fig. 4D) but to levels below 50% of the wildtype. The SHOX fragments appeared to be less stable and the SHOX interacting domain with SHOX2 was not clearly visible. Thus, further analysis was undertaken using eight SHOX missense mutations observed in LWD patients and located throughout the protein (Fig. 4E). The SHOX homeodomain mutants p.L132V and p.A170P showed a significant reduction in their interaction capacity with SHOX2 (Fig. 4E), whilst the OAR mutant p.D278A, had a reduced interaction but to a lesser extent (Fig. 4E). Therefore, the SHOX homeodomain appears to be the domain principally involved in the interaction with SHOX2 whilst the OAR domain appears to stabilize the interaction.

### **SHOX2 is coexpressed with SHOX, SOX5, SOX6 and SOX9 in the human growth plate**

Tissue and time dependent coexpression of proteins must occur for the interactions to occur between these proteins. Previous studies have shown that *SHOX2* expression overlaps with *SHOX* and *SOX9* in certain regions and stages of limb development [17, 18].

We firstly studied if SHOX2 is expressed in human fetal tibia growth plates of different developmental stages by immunohistochemistry, and showed that SHOX2 is expressed in the reserve, proliferative and hypertrophic zones at 18, 27, 32 and 38-weeks (Fig.

S3). Subsequently, we also demonstrated that SHOX2 is coexpressed with SHOX, SOX5, SOX6 and SOX9 proteins in the three differentiation regions of 18 and 38-weeks human fetal tibia growth plates (Fig. 5 and S4).

### ***SHOX2* mutations are not responsible for the LWD phenotype in our cohort of patients with unknown molecular defect**

Defects in SHOX or its regulatory elements have been identified in ~70% of LWD patients [33, 39, 40], whilst the remaining ~30% remain genetically uncharacterized. Screening of the coding regions and intron-exon boundaries of *SHOX2* in 83 LWD patients with no known defect was performed using HRM. Samples with abnormal melting profiles were subsequently sequenced. Complete or intragenic *SHOX2* deletions/duplications were analysed using four microsatellite markers surrounding *SHOX2* (Table S4) or by a self-designed MLPA assay (Table S5).

Only two variants were identified, both located in exon 1 of *SHOX2*: a duplication of three glycines in the glycine-rich repeat, p.Gly77-Gly78dup (c.232\_233dupGAGGAGGTG) and a missense mutation p.E21K (c.61G>A). We therefore evaluated the pathogenicity of these variants by determining their frequencies in control populations and by analyzing their cosegregation with the LWD phenotype when possible. In contrast to SHOX, where insertions and deletions of the homologous SHOX glycine repeat have been described in patients with LWD/ISS (SHOX mutation database, [www.hd-lovd.uni-hd.de](http://www.hd-lovd.uni-hd.de)), the SHOX2 glycine repeat length appears to be a non-pathogenic CNV, since 183/7815 controls (Exome Variant Server) and 3/95 Spanish control individuals with normal heights carried this three amino acid insertion. The second mutation, p.E21K was assessed in the control population and in family members. Although the p.E21K mutation was only present in 2/12092 individuals (Exome Variant Server) and was absent in the 95 Spanish normal height controls, it did not

cosegregate with the phenotype in the family (data not shown). Thus, *SHOX2* is not the molecular cause of the studied LWD cases.

## DISCUSSION

We have demonstrated that *SHOX2* regulates *NPPB* directly whilst activating *ACAN* via its cooperation with the SOX trio. The *SHOX2* activation of the *NPPB* promoter was even higher than that observed for *SHOX*. Both analysed *SHOX2* mutants, p.L155V with reduced dimerization capacity and the p.Q234X lacking the OAR domain, failed to upregulate *NPPB*, thus suggesting that the *SHOX2* homeodomain and the transactivation domain are both critical for the *NPPB* activation.

A role for *NPPB* during endochondral ossification and longitudinal growth was initially suggested by the observation of skeletal overgrowth and alterations in the growth plate of *Nppb* transgenic mice [41]. Despite this, no further implication in skeletal development has been reported to date. In contrast, the involvement of BNP in cardiovascular function is much clearer, to the extent that this peptide is a biomarker for diagnosis and prognosis of heart failure [42]. Given that *Shox2* participates in heart development as shown by different knockout mice models [20, 22, 23], it is tempting to speculate that *Shox2* also regulates *Nppb* expression in heart and that the disruption of this pathway is critical for the heart failure in *Shox2* knockout mice models.

The other *SHOX2* transcriptional target discovered in this work is *ACAN*, which codifies for Aggrecan, a main component of the cartilage extracellular matrix. Previously, our group demonstrated that *SHOX* interacts with SOX5/SOX6 to cooperate with SOX9 in the activation of *ACAN* [19]. As with *SHOX*, *SHOX2* cannot directly activate the *Acan* enhancer but requires the cooperation of the SOX trio. The *SHOX2* homeodomain and OAR domains are both critical for this *Acan* induction, since mutants in both domains failed to upregulate

*Acan*. In this work, we have also demonstrated that SHOX2 interacts with SOX5 and SOX6. The SHOX2 homeodomain was shown to interact with the SOX6 HMG domain, thus in agreement with the results observed with SHOX-SOX6 [14] and other protein interactions [43-45]. Interestingly, the p.K139E mutant, located in the amino acid adjacent to the homeodomain of SHOX2, reduced its interaction capacity with SOX6 as observed previously with the homologous SHOX mutant, p.K116E [14], thus, implicating that this amino acid is also important for the interaction.

Our finding the homeodomain of SHOX and SHOX2 is implicated in the heterodimerization agrees with previous studies of other homeodomain proteins [46]. This interaction could: 1) alter the transactivation of their transcription targets by interacting with different cofactors and/or binding to DNA with different affinities; and 2) regulate different transcription targets, compared to that of the homodimers. More research is required in order to decipher the biological function of the discovered SHOX-SHOX2 protein interaction.

For these interactions to have physiological importance, SHOX and SHOX2 have to be coexpressed in a tissue and time dependent manner. It has been reported that SHOX is mainly expressed in the mesomelic portion of the limbs whilst SHOX2 expression occurs in the rhizomelic region, but overlapping expression has been observed [17, 18]. Further evidence of SHOX expression in the rhizomelic region has been shown in LMD individuals who lack SHOX, but present with both mesomelic and rhizomelic shortening of the limbs [47]. *Shox2* expression has also been detected in the mesomelic parts of the limbs in mouse [25, 48], although it is difficult to extrapolate this data to humans due to the lack of a SHOX ortholog in mouse. In this work, we have demonstrated that SHOX and SHOX2, and also the SOX trio members are coexpressed in human tibial growth plates at different developmental stages. This data thus, argues for the coexpression of SHOX and SHOX2 proteins in some limb regions during specific time points.

Therefore, due to the high homology between SHOX and SHOX2 and their identical homeodomains, their overlapping expression in some limb regions, the sharing of transcriptional targets implicated in limb development (i.e. *NPPB* and *ACAN*) and the total rescue of the heart defects and its tissue-specific rescue in limbs when *SHOX* was expressed in the *Shox2*KI/KI mice [28], we argue for the existence of functional redundancy between SHOX and SHOX2 in a tissue-specific manner during human embryonic development. An interesting argument for this redundancy is shown by the LWD phenotype. In these patients, the skeletal deformities, i.e. the characteristic Madelung deformity, is more pronounced in the distal region of the upper limb, where there is no SHOX-SHOX2 coexpression, and thus SHOX2 cannot rescue the SHOX haploinsufficiency. However, in the more proximal region of the radius and ulna, SHOX and SHOX2 are coexpressed, thus, SHOX2 may be able to rescue the phenotype. But, in the case of LMD, SHOX2 is unable to rescue the phenotype caused by the complete absence of SHOX, thus, this rescue mechanism may have a limiting threshold.

As we have shown that SHOX2 shares cofactors and transcription factors implicated in skeletal growth, we screened for *SHOX2* alterations in a cohort of 83 patients with LWD or possible LWD with no known PAR1 defect. No pathogenic alteration was detected. Analyses of the Decipher database ([www.decipher.sanger.ac.uk/](http://www.decipher.sanger.ac.uk/)) entries revealed the presence of eight patients with copy number variants (CNVs) of *SHOX2*. The majority of these patients had multiple CNVs located throughout the genome and no common clinical phenotype was observed. Only two patients presented with one large CNV at the *SHOX2* locus, but again no common phenotype was described. As SHOX2 appears to have a broad expression pattern [17] and the *Shox2*<sup>-/-</sup> mouse has heart, palate and skeletal defects [20], we postulate that individuals with *SHOX2* defects may present with a more severe phenotype: limb shortening, heart anomalies and/or cleft palate.



In summary, we have demonstrated that SHOX2, like SHOX, activates *NPPB* directly whilst activation of *ACAN* is through the cooperation with the SOX trio, adding further support to the theory that there is functional redundancy between SHOX and SHOX2 during human embryonic development in a tissue-specific manner.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank all the clinicians and patients who participated in the study; Dr. Shiro Ikewaga and Dr. Toshiyuki Ikeda for the SOX5 and SOX6 cDNA clones, respectively and Dr. Veronique Lefebvre for the (4XA1)pCol2Luc plasmid.

## REFERENCES

1. Rao E, Weiss B, Fukami M, Rump A, Niesler B, et al. (1997) Pseudoautosomal deletions encompassing a novel homeobox gene cause growth failure in idiopathic short stature and Turner syndrome. *Nat Genet* 16: 54-63.
2. Belin V, Cusin V, Viot G, Girlich D, Toutain A, et al. (1998) SHOX mutations in dyschondrosteosis (Leri-Weill syndrome). *Nat Genet* 19: 67-69.
3. Shears DJ, Vassal HJ, Goodman FR, Palmer RW, Reardon W, et al. (1998) Mutation and deletion of the pseudoautosomal gene SHOX cause Leri-Weill dyschondrosteosis. *Nat Genet* 19: 70-73.
4. Benito-Sanz S, Thomas NS, Huber C, Gorbenko-del Blanco D, Aza-Carmona M, et al. (2005) A novel class of Pseudoautosomal region 1 deletions downstream of SHOX is associated with Leri-Weill dyschondrosteosis. *Am J Hum Genet* 77: 533-544.

5. Campos-Barros A, Benito-Sanz S, Ross JL, Zinn AR, Heath KE. (2007) Compound heterozygosity of SHOX-encompassing and downstream PAR1 deletions results in Langer mesomelic dysplasia (LMD). *Am J Med Genet A* 143: 933-938.
6. Bertorelli R, Capone L, Ambrosetti F, Garavelli L, Varriale L, et al. (2007) The homozygous deletion of the 3' enhancer of the SHOX gene causes Langer mesomelic dysplasia. *Clin Genet* 72: 490-491.
7. Benito-Sanz S, Barroso E, Heine-Suñer D, Hisado-Oliva A, Romanelli V, et al. (2011) Clinical and molecular evaluation of SHOX/PAR1 duplications in Leri-Weill dyschondrosteosis (LWD) and idiopathic short stature (ISS). *J Clin Endocrinol Metab* 96(2): 404-12.
8. Benito-Sanz S, Aza-Carmona M, Rodríguez-Estevez A, Rica-Etxebarria I, Gracia R, et al. (2012) Identification of the first PAR1 deletion encompassing upstream SHOX enhancers in a family with idiopathic short stature. *Eur J Hum Genet* 20(1): 125-7.
9. Benito-Sanz S, Royo JL, Barroso E, Paumard-Hernández B, Barreda-Bonis AC, et al. (2012) Identification of the first recurrent PAR1 deletion in Léri-Weill dyschondrosteosis and idiopathic short stature reveals the presence of a novel SHOX enhancer. *J Med Genet* 49(7): 442-50.
10. Nicolosi A, Caruso-Nicoletti M. (2011) Epidemiology of SHOX deficiency. *J Endocrinol Invest* 33(6 Suppl): 7-10.
11. Blaschke RJ, Monaghan AP, Schiller S, Schechinger B, Rao E, et al. (1998) SHOT, a SHOX-related homeobox gene, is implicated in craniofacial, brain, heart, and limb development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(5): 2406-11.
12. Marchini A, Häcker B, Marttila T, Hesse V, Emons J, et al. (2007) BNP is a transcriptional target of the short stature homeobox gene SHOX. *Hum Mol Genet* 16: 3081-3087.

13. Decker E, Durand C, Bender S, Rödelisperger C, Glaser A, et al. (2011) FGFR3 is a target of the homeobox transcription factor SHOX in limb development. *Hum Mol Genet* 20(8): 1524-35.
14. Aza-Carmona M, Shears DJ, Yuste-Checa P, Barca-Tierno V, Hisado-Oliva A, et al. (2011) SHOX interacts with the chondrogenic transcription factors SOX5 and SOX6 to activate the aggrecan enhancer. *Hum Mol Genet* 20(8): 1547-59.
15. Kmita M, Tarchini B, Zákány J, Logan M, Tabin CJ, et al. (2005) Early developmental arrest of mammalian limbs lacking HoxA/HoxD gene function. *Nature* 435(7045): 1113-6.
16. Durand C, Decker E, Roeth R, Schneider KU, Rappold G. (2012) The homeobox transcription factor HOXA9 is a regulator of SHOX in U2OS cells and chicken micromass cultures. *PLoS One* 7(9): e45369.
17. Clement-Jones M, Schiller S, Rao E, Blaschke RJ, Zuniga A, et al. (2000) The short stature homeobox gene SHOX is involved in skeletal abnormalities in Turner syndrome. *Hum Mol Genet* 9: 695-702.
18. Tiecke E, Bangs F, Blaschke R, Farrell ER, Rappold G, et al. (2006) Expression of the short stature homeobox gene Shox is restricted by proximal and distal signals in chick limb buds and affects the length of skeletal elements. *Dev Biol* 298: 585-596.
19. Munns CJ, Haase HR, Crowther LM, Hayes MT, Blaschke R, et al. (2004) Expression of SHOX in human fetal and childhood growth plate. *J Clin Endocrinol Metab* 89(8): 4130-5.
20. Yu L, Gu S, Alappat S, Song Y, Yan M, et al. (2005) Shox2-deficient mice exhibit a rare type of incomplete clefting of the secondary palate. *Development* 132(19): 4397-406.
21. Blaschke RJ, Hahurij ND, Kuijper S, Just S, Wisse LJ, et al. (2007) Targeted mutation reveals essential functions of the homeodomain transcription factor Shox2 in sinoatrial and pacemaking development. *Circulation* 115(14): 1830-8.

22. Espinoza-Lewis RA, Yu L, He F, Liu H, Tang R, et al. (2009) Shox2 is essential for the differentiation of cardiac pacemaker cells by repressing Nkx2-5. *Dev Biol* 327(2): 376-85.
23. Puskaric S, Schmitteckert S, Mori AD, Glaser A, Schneider KU, et al. (2010) Shox2 mediates Tbx5 activity by regulating Bmp4 in the pacemaker region of the developing heart. *Hum Mol Genet* 19(23): 4625-33.
24. Espinoza-Lewis RA, Liu H, Sun C, Chen C, Jiao K, et al. (2011) Ectopic expression of Nkx2.5 suppresses the formation of the sinoatrial node in mice. *Dev Biol* 356(2): 359-69.
25. Cobb J, Dierich A, Huss-Garcia Y, Duboule D. (2006) A mouse model for human short-stature syndromes identifies Shox2 as an upstream regulator of Runx2 during long-bone development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(12): 4511-5.
26. Bobick BE, Cobb J. (2012) Shox2 regulates progression through chondrogenesis in the mouse proximal limb. *J Cell Sci* 125(24): 6071-83.
27. Yu L, Liu H, Yan M, Yang J, Long F, et al. (2007) Shox2 is required for chondrocyte proliferation and maturation in proximal limb skeleton. *Dev Biol* 306(2): 549-59.
28. Liu H, Chen CH, Espinoza-Lewis RA, Jiao Z, Sheu I, et al. (2011) Functional redundancy between human SHOX and mouse Shox2 genes in the regulation of sinoatrial node formation and pacemaking function. *J Biol Chem* 286(19): 17029-38.
29. Han Y, Lefebvre V. (2008) L-Sox5 and Sox6 drive expression of the aggrecan gene in cartilage by securing binding of Sox9 to a far-upstream enhancer. *Mol Cell Biol* 28: 4999-5013.
30. Rao E, Blaschke RJ, Marchini A, Niesler B, Burnett M, et al. (2001) The Leri-Weill and Turner syndrome homeobox gene SHOX encodes a cell-type specific transcriptional activator. *Hum Mol Genet* 10: 3083-3091.

31. Sobradillo B, Aguirre A, Aresti U, Bilbao A, Fernández-Ramos C, et al. (2002) Curvas y Tablas de crecimiento (Estudios Longitudinal y Transversal). In: Fundación Faustino Orbegoza Eizaguirre Bilbao. pp. 1-36.
32. Benito-Sanz S, Gorbenko-del Blanco D, Huber C, Thomas NS, Aza-Carmona M, et al. (2006) Characterization of SHOX deletions in Leri-Weill dyschondrosteosis (LWD) reveals genetic heterogeneity and no recombination hotspots. *Am J Hum Genet* 79: 409-414.
33. Benito-Sanz S, del Blanco DG, Aza-Carmona M, Magano LF, Lapunzina P, et al. (2006) PAR1 deletions downstream of SHOX are the most frequent defect in a Spanish cohort of Léri-Weill dyschondrosteosis (LWD) probands. *Hum Mutat* 27(10): 1062.
34. Nicolaides NC, Stoeckert CJ Jr (1990) A simple, efficient method for the separate isolation of RNA and DNA from the same cells. *Biotechniques* 8: 154-156.
35. Smits P, Li P, Mandel J, Zhang Z, Deng JM, et al. (2001) The transcription factors L-Sox5 and Sox6 are essential for cartilage formation. *Dev Cell* 1: 277–290.
36. Wilson D, Sheng G, Lecuit T, Dostatni N, Desplan C. (1993) Cooperative dimerization of paired class homeo domains on DNA. *Genes Dev* 7(11): 2120-34.
37. Schneider KU, Marchini A, Sabherwal N, Röth R, Niesler B, et al. (2005) Alteration of DNA binding, dimerization, and nuclear translocation of SHOX homeodomain mutations identified in idiopathic short stature and Leri-Weill Dyschondrosteosis. *Hum Mut* 26(1):1-9.
38. Lefebvre V, Behringer RR, de Crombrughe B. (2001) L-Sox5, Sox6 and Sox9 control essential steps of the chondrocyte differentiation pathway. *Osteoarthritis Cartilage* 9 Suppl A: S69-75.

39. Huber C, Rosilio M, Munnich A, Cormier-Daire V; French SHOX GeNeSIS Module. (2006) High incidence of SHOX anomalies in individuals with short stature. *J Med Genet* 43: 735-739.
40. Chen J, Wildhardt G, Zhong Z, Roeth R, Weiss B, et al. (2009) Enhancer mutations of the SHOX gene as a frequent cause of short stature – the essential role of a 250 kb downstream regulatory domain. *J Med Genet* 46: 834-839.
41. Suda M, Ogawa Y, Tanaka K, Tamura N, Yasoda A, et al. (1998) Skeletal overgrowth in transgenic mice that overexpress brain natriuretic peptide. *Proc Natl Acad Sci* 95: 2337–2342.
42. Maisel A, Mueller C, Adams K Jr, Anker SD, Aspromonte N, et al. (2008) State of the art: using natriuretic peptide levels in clinical practice. *Eur J Heart Fail* 10(9): 824-39.
43. Grueneberg DA, Simon KJ, Brennan K, Gilman M. (1995) Sequence-specific targeting of nuclear signal transduction pathways by homeodomain proteins. *Mol Cell Biol* 15(6): 3318-26.
44. Wolberger C. (1996) Homeodomain interactions. *Curr Opin Struct Biol* 6(1): 62-8.
45. Wissmüller S, Kosian T, Wolf M, Finzsch M, Wegner M. (2006) The high-mobility-group domain of Sox proteins interacts with DNA-binding domains of many transcription factors. *Nucleic Acids Res* 34: 1735-1744.
46. Li T, Stark MR, Johnson AD, Wolberger C. (1995) Crystal structure of the MATA1/MATA2 homeodomain heterodimer bound to DNA. *Science* 270(5234): 262-9.
47. Zinn AR, Wei F, Zhang L, Elder FF, Scott CI Jr, et al. (2002) Complete SHOX deficiency causes Langer mesomelic dysplasia. *Am J Med Genet* 110(2): 158-63.
48. Semina EV, Reiter RS, Murray JC. (1998) A new human homeobox gene OGI2X is a member of the most conserved homeobox gene family and is expressed during heart development in mouse. *Hum Mol Genet* 7(3): 415-22.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1: SHOX2 transactivates *NPPB* and *ACAN*.** Luciferase reporter activity of U2OS cells transfected with reporter plasmids containing the *NPPB* promoter (A) or the *Acan* enhancer (B), renilla luciferase control plasmid and different combinations of SHOX, SHOX2, SHOX2(p.L155V), SHOX2(p.Q234X), SOX6 and SOX9 expression plasmid as indicated. Fold-increase values were obtained by normalizing the relative luciferase units of each sample with the relative luciferase units of the sample transfected only with the reporter plasmid. All values represent the mean and standard deviation of three independent samples, with each sample assayed in triplicate. Significant p-values obtained comparing different independent samples are indicated with an asterisk (\* $<0.05$  and \*\* $<0.001$ ).

**Fig. 2: Identification and characterization of the SHOX2 dimerization.** A) SHOX2a and SHOX2b homo- and hetero-dimerize in the yeast-two hybrid system. The *S. cerevisiae* strain Y187 was cotransformed with pGBT9 (containing the GAL4 binding domain – BD) and pACT2 (containing the GAL4 activation domain – AD) vectors. Interactions were determined using a  $\beta$ -galactosidase liquid assay with CRPG as substrate. Empty vectors were employed as negative controls. B) Characterization of the SHOX2 domains involved in the SHOX2 dimerization. The SHOX2 protein structure showing the amino acid location of the homeodomain (HD) and the OAR domain is shown with the various analysed SHOX2 fragments, indicating their name and amino acids that they contain. To the right of each fragment the corresponding yeast two-hybrid results are shown. Y187 cells were cotransformed with SHOX2 in the pGBT9 vector and SHOX2 fragments in the pACT2 vector. Protein interaction percentages were obtained by normalizing the  $\beta$ -galactosidase units of the different SHOX2 fragments to that obtained with full-length SHOX2. Empty vectors

were employed as negative controls. C) SHOX2 mutants impair the SHOX2 dimerization. SHOX2 protein structure scheme showing the localization of the seven analysed missense mutations. Yeast two-hybrid assay of Y187 cotransformed cells with SHOX2 in the pGBT9 vector and the different SHOX2 mutants in the pACT2 vector. Protein interaction percentages were obtained by normalizing the  $\beta$ -galactosidase units of the various SHOX2 mutants to the wildtype SHOX2. Empty vectors were employed as negative controls.

**Fig. 3: Identification and characterization of the SHOX2-SOX5 and SHOX2-SOX6 protein interactions.** A) SHOX2 interacts with SOX5 and SOX6 in the yeast-two hybrid system. The *S. cerevisiae* strain Y187 was cotransformed with the pGBT9 (BD) and pACT2 (AD) vectors. Interactions were determined by using a  $\beta$ -galactosidase liquid assay with CRPG as substrate. Empty vectors were employed as negative controls. B) SHOX2 interacts with SOX5 and SOX6 in human cells. Nuclear extracts of HEK293 cells overexpressing FLAG:SHOX2 and HA:SOX5 or HA:SOX6 were immunoprecipitated using anti-FLAG-agarose. Western blots (WB) of immunoprecipitates (IP) were probed with SHOX2, SOX5 and SOX6 antibodies. Nuclear extracts corresponding to 10% input were included as protein expression controls and nuclear extract immunoprecipitates of cells transfected only with HA:SOX5 or HA:SOX6 were included as negative controls. The western-blot images clearly show that SOX5 and SOX6 immunoprecipitate only in the presence of SHOX2. C) Characterization of the SHOX2 domains involved in the interaction with SOX6. An scheme of the SHOX2 protein structure showing the amino acid location of the homeodomain (HD) and the OAR domain is shown with the various analysed SHOX2 fragments, indicating their name and the amino acids that they contain. To the right of each fragment, the corresponding yeast two-hybrid results are shown. Y187 cells were cotransformed with SOX6 in the pGBT9 vector and the SHOX2 fragments in the pACT2 vector. Protein interaction percentages were



obtained by normalizing the  $\beta$ -galactosidase units of the different SHOX2 fragments to that obtained with full-length SHOX2. Empty vectors were employed as negative controls. D) SHOX2 mutants impair the interaction with SOX6. SHOX2 protein structure scheme showing the localization of the seven missense mutations analyzed. Yeast two-hybrid assay of Y187 cotransformed cells with SOX6 in the pGBT9 vector and the different SHOX2 mutants in the pACT2 vector. Protein interaction percentages were obtained by normalizing the  $\beta$ -galactosidase units of the various SHOX2 mutants to the wildtype SHOX2. Empty vectors were employed as negative controls. E) Characterization of SOX6 domains involved in the interaction with SHOX2 using the yeast two-hybrid assay. SOX6 is schematically drawn showing the amino acid location of two dimerization domains, the first and the second coiled-coils (1st cc and 2nd cc, respectively), and the HMG DNA-binding domain. Depicted below are the SOX6 generated constructs, indicating the name of each fragment and the amino acids that they contain. Y187 cotransformed cells with the different SOX6 fragments in the pGBT9 vector and SHOX2 in the pACT2 vector. The protein interaction percentages were obtained by normalizing the  $\beta$ -galactosidase units of the different SOX6 fragments to that obtained with full-length SOX6. Empty vectors were employed as negative controls.

**Fig. 4: Identification and characterization of the SHOX2-SHOX interaction.** A) SHOX2 interacts with SHOX in the yeast-two hybrid system. The *S. cerevisiae* strain Y187 was cotransformed with the pGBT9 (BD) and pACT2 (AD) vectors. Interactions were determined by using a  $\beta$ -galactosidase liquid assay with CRPG as substrate. Empty vectors were employed as negative controls. B) SHOX2 interacts with SHOX in human cells. Nuclear extracts of HEK293 cells overexpressing FLAG:SHOX2 and HA:SHOX were immunoprecipitated using anti-FLAG-agarose. Western blots (WB) of immunoprecipitates (IP) were probed with SHOX2 and SHOX antibodies. Nuclear extracts corresponding to 10%

input were included as protein expression controls and nuclear extract immunoprecipitates of cells transfected only with HA:SHOX were included as negative controls. The western-blot images clearly show that SHOX immunoprecipitate only in the presence of SHOX2. C) Characterization of the SHOX2 domains involved in the interaction with SHOX. An scheme of the SHOX2 protein structure showing the amino acid location of the homeodomain (HD) and the OAR domain is drawn together with the various SHOX2 fragments analysed, indicating the name of each fragment the amino acids that they contain. Yeast two-hybrid assay of Y187 cells cotransformed with SHOX in the pGBT9 vector and different SHOX2 fragments in the pACT2 vector. Protein interaction percentages were obtained by normalizing the  $\beta$ -galactosidase units of the different SHOX2 fragments to that obtained with full-length SHOX2. Empty vectors were employed as negative controls. D) Characterization of the SHOX domains involved in the interaction with SHOX2 using the yeast two-hybrid assay. An scheme of the SHOX protein structure showing the amino acid location of the homeodomain (HD) and the OAR domain is shown with the various SHOX fragments analysed, indicating their name and the amino acids that they contain. To the right of each fragment are the corresponding yeast two-hybrid results. Y187 cells were cotransformed with the different SHOX fragments in the pGBT9 vector and with SHOX2 in the pACT2 vector. Protein interaction percentages were obtained by normalizing the  $\beta$ -galactosidase units of the different SHOX fragments to that obtained with full-length SHOX. Empty vectors were employed as negative controls. E) SHOX mutants impair the SHOX2-SHOX interaction. SHOX protein structure scheme showing the homeodomain (HD), the OAR domain and the localization of the eight analyzed missense mutations. Yeast two-hybrid assay of Y187 cotransformed cells with the different SHOX mutants in the pGBT9 vector and SHOX2 in the pACT2 vector. Protein interaction percentages were obtained by normalizing the  $\beta$ -galactosidase units of the

various SHOX mutants to the wildtype SHOX. Empty vectors were employed as negative controls.

**Fig. 5: SHOX2 is coexpressed with SHOX, SOX5, SOX6 and SOX9 in the 18-week human fetal growth plate.** Immunohistochemistry performed on 18-week human fetal tibia growth plates using antibodies against SHOX, SHOX2, SOX5, SOX6 and SOX9. Specific staining can be observed in the reserve (R), proliferative (P) and hypertrophic (H) zones of the growth plate for all analysed proteins. Images performed at 20x magnification.

Figure 1

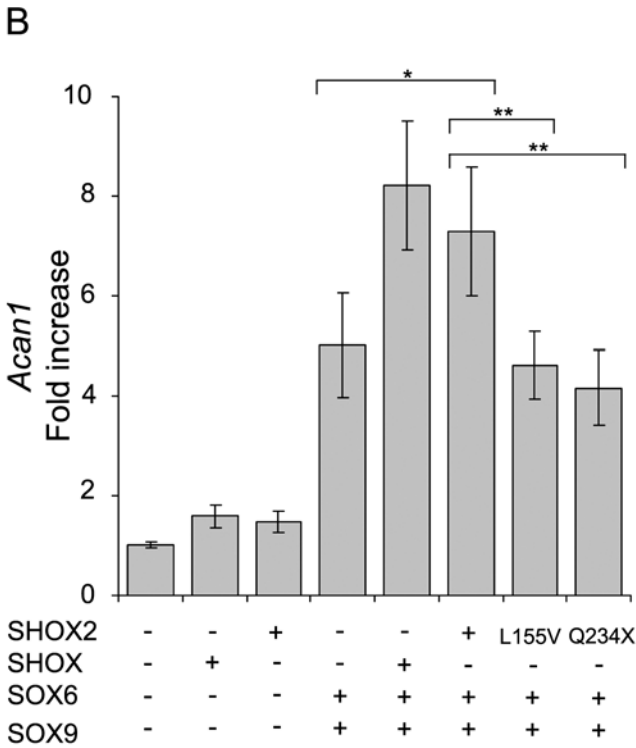
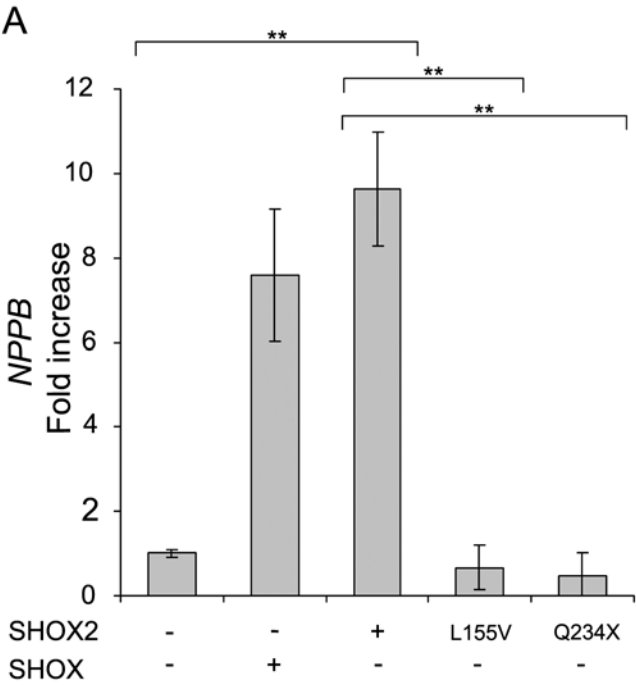
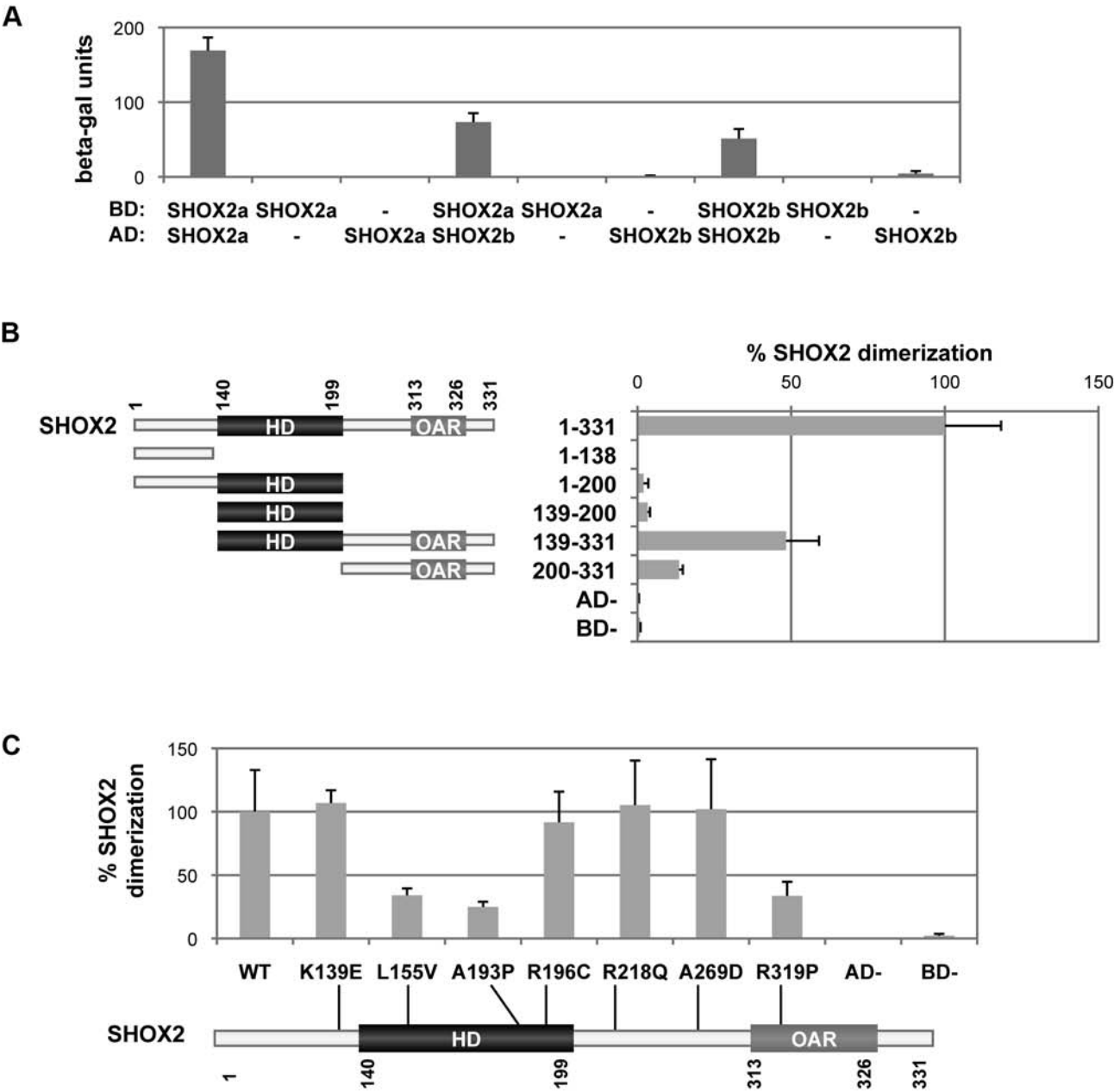
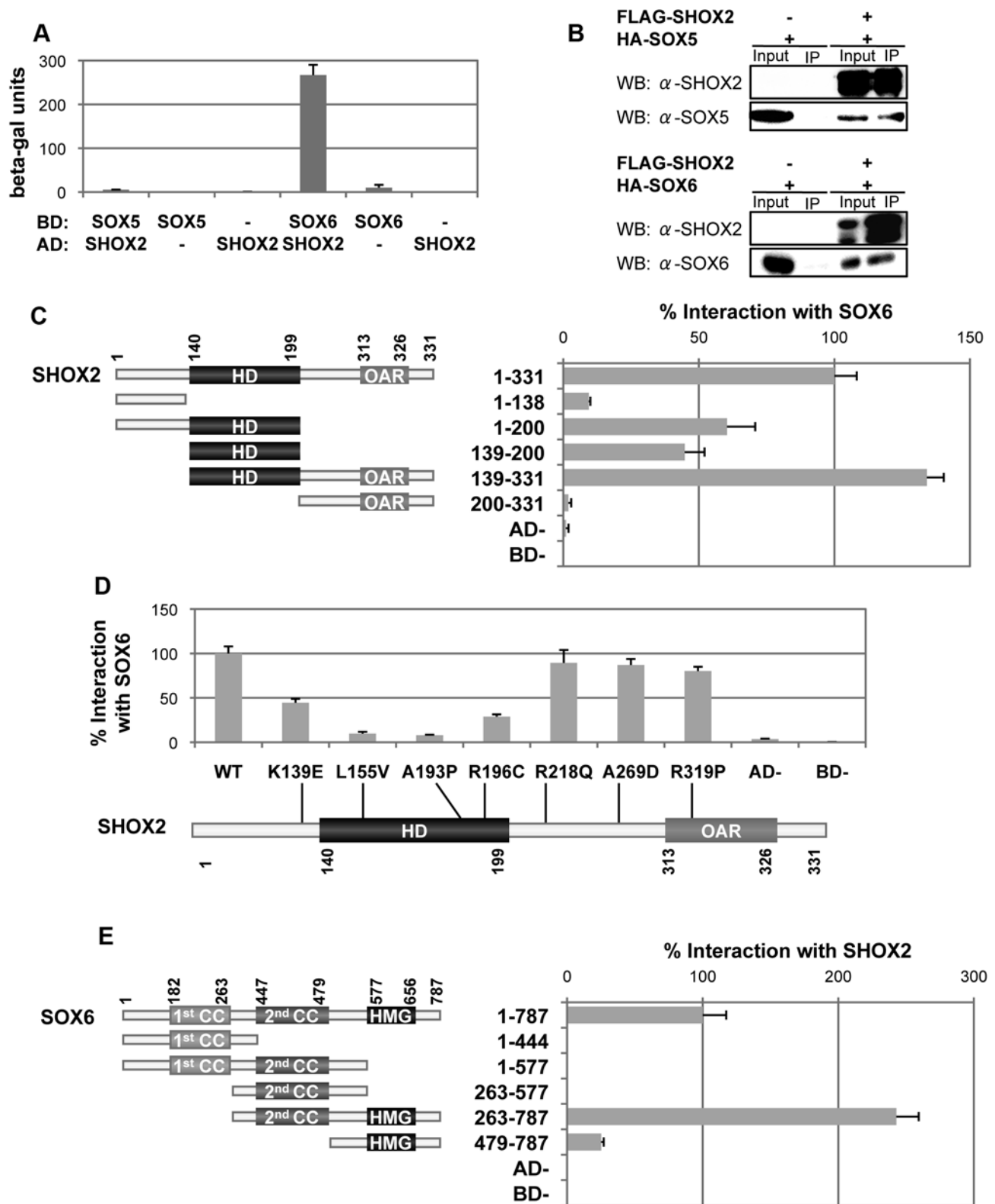


Figure 2



**Figure 3**



**Figure 4**

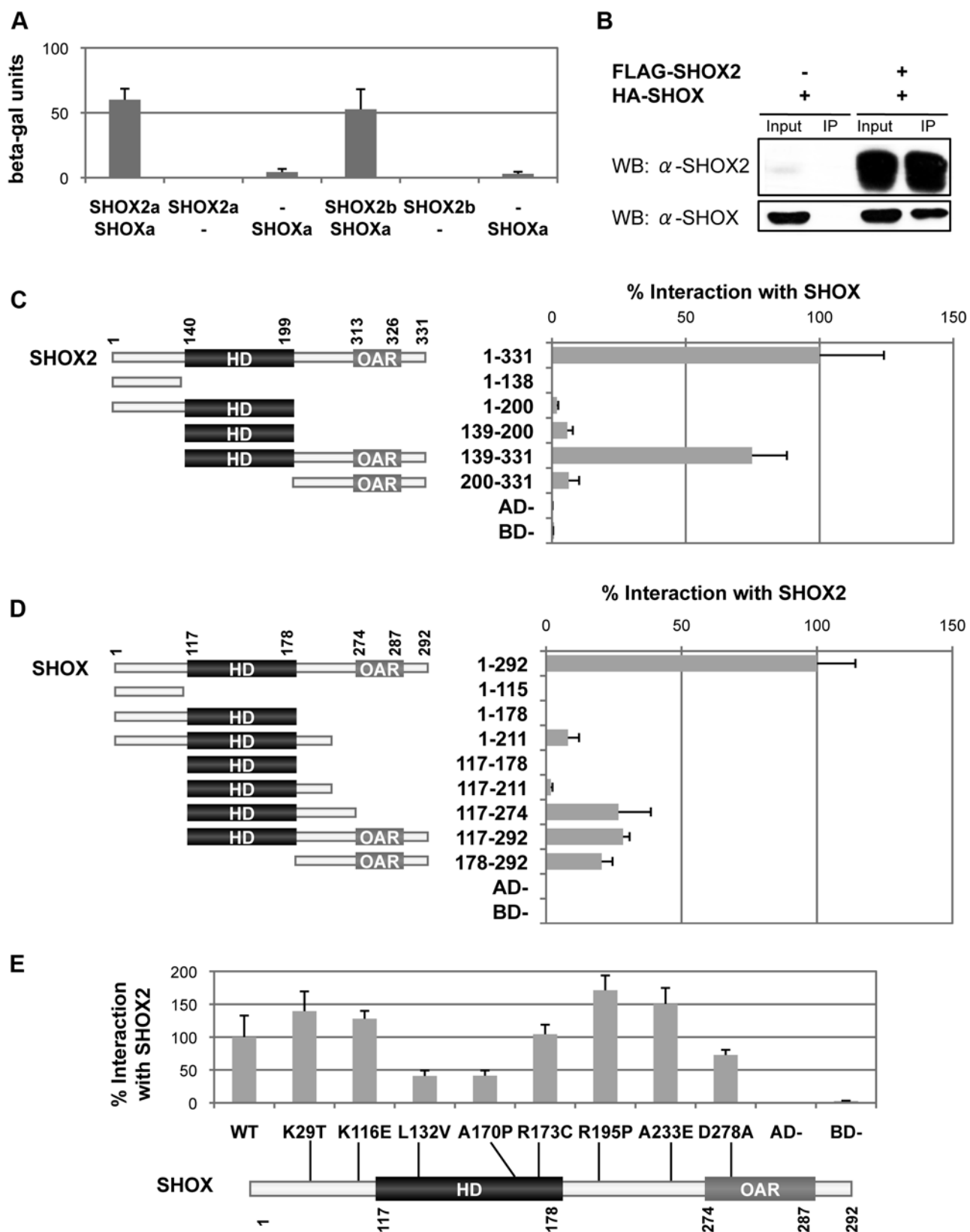


Fig.5

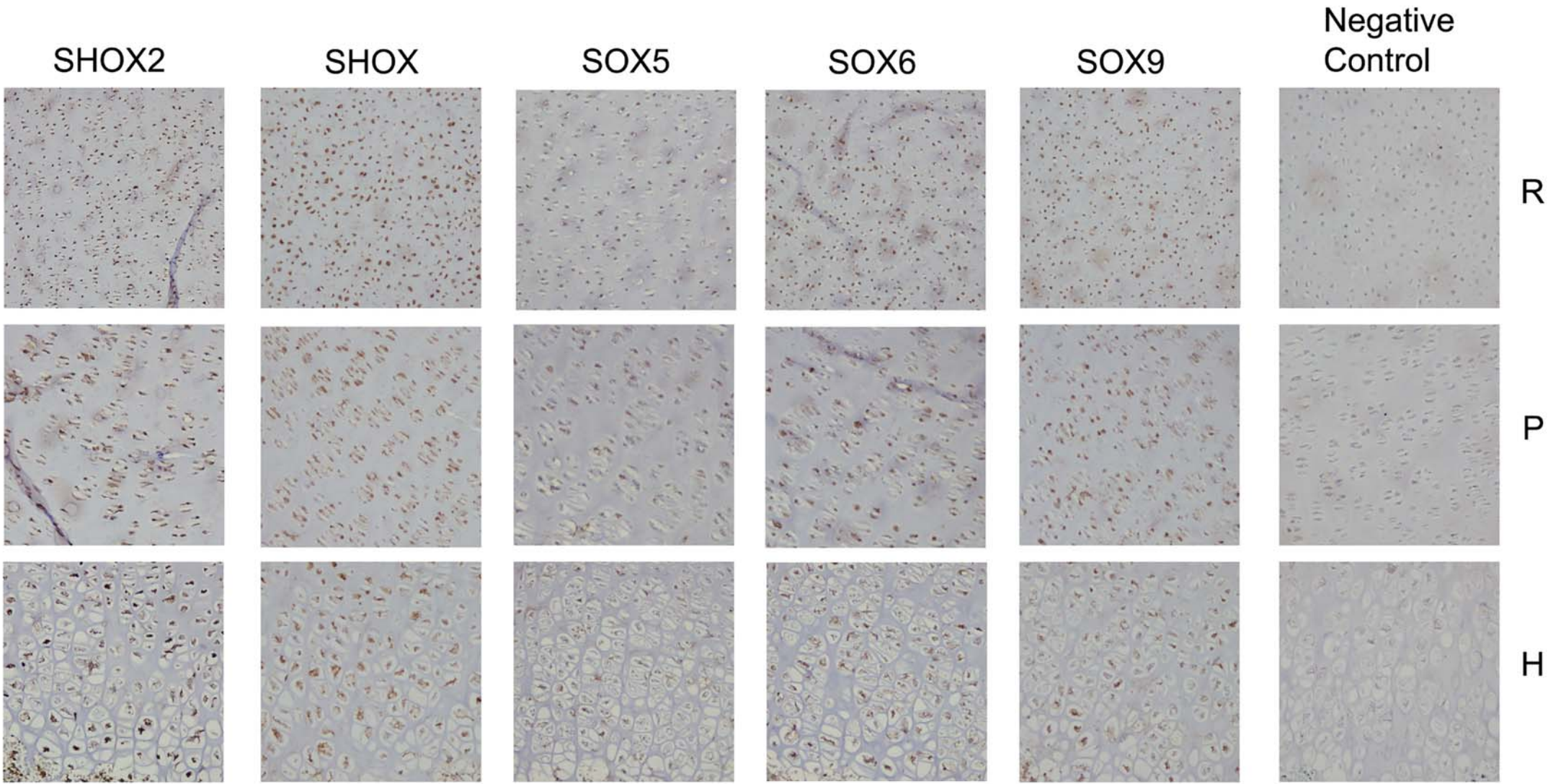
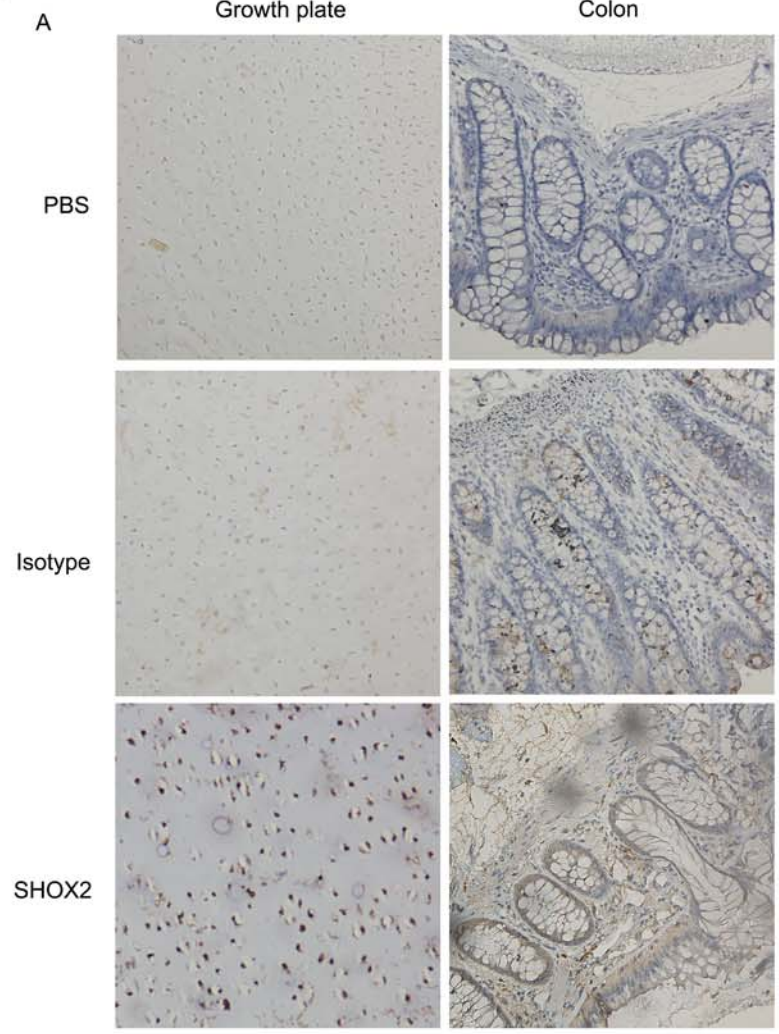




Fig.S1



**B**

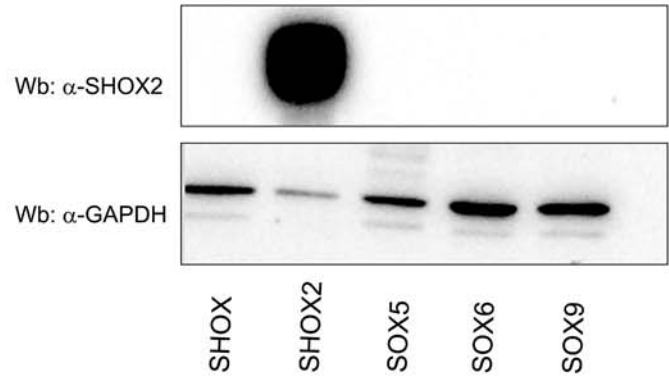


Fig. S2

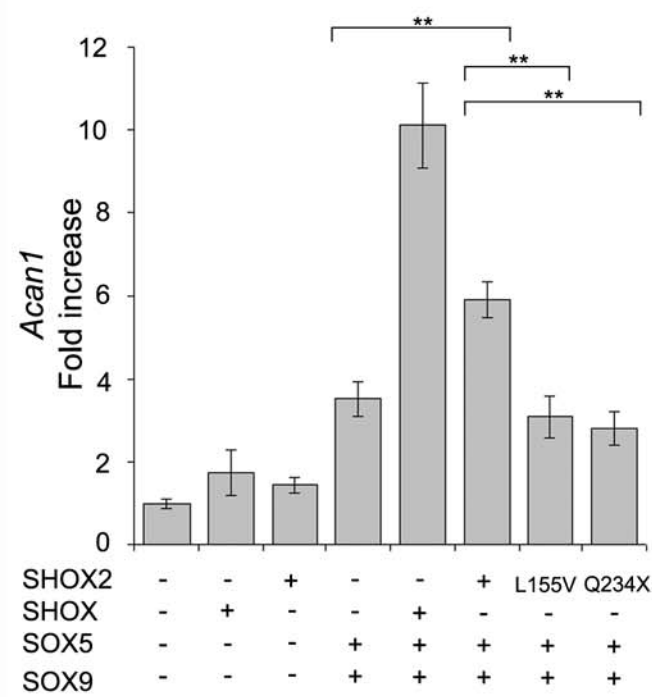


Fig S3

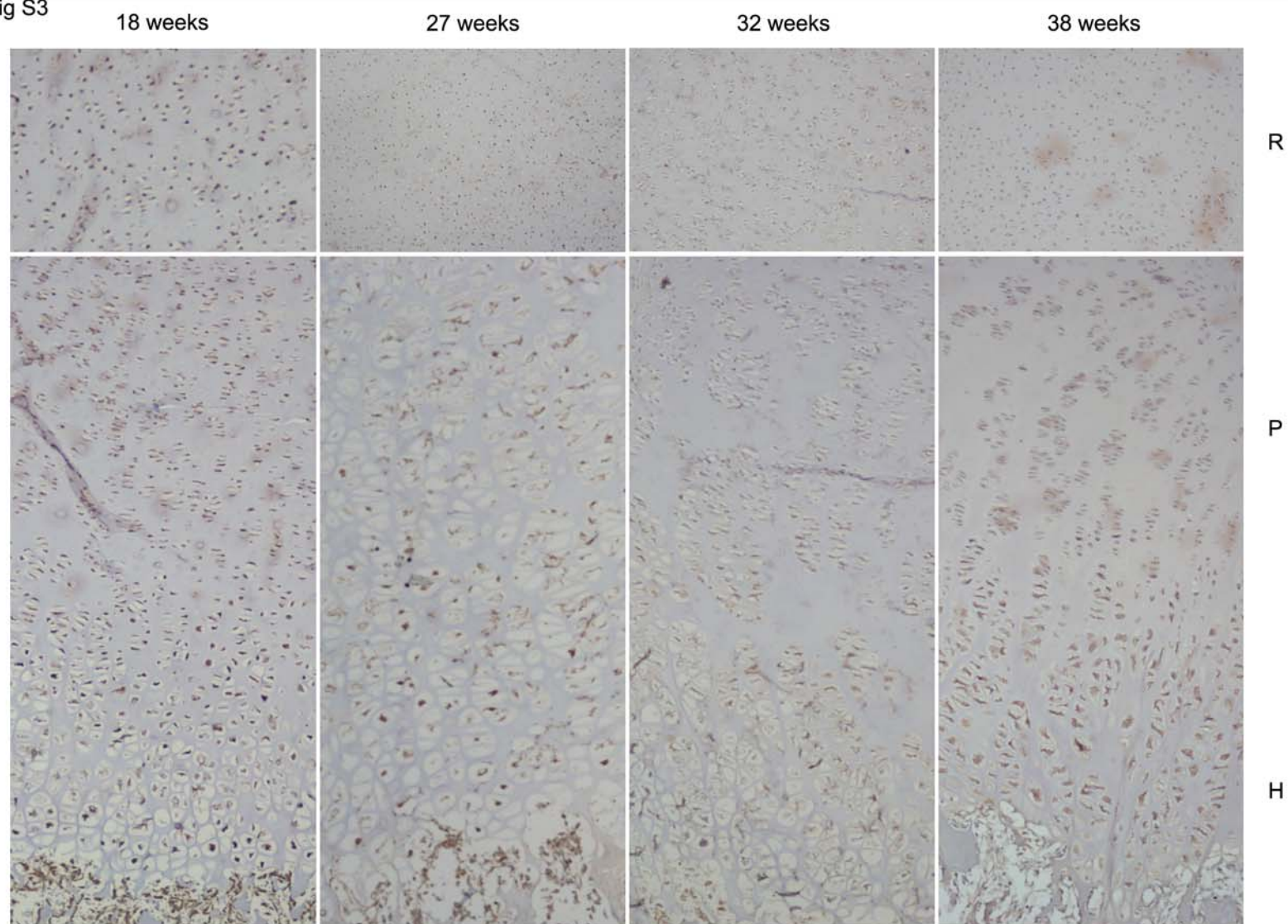
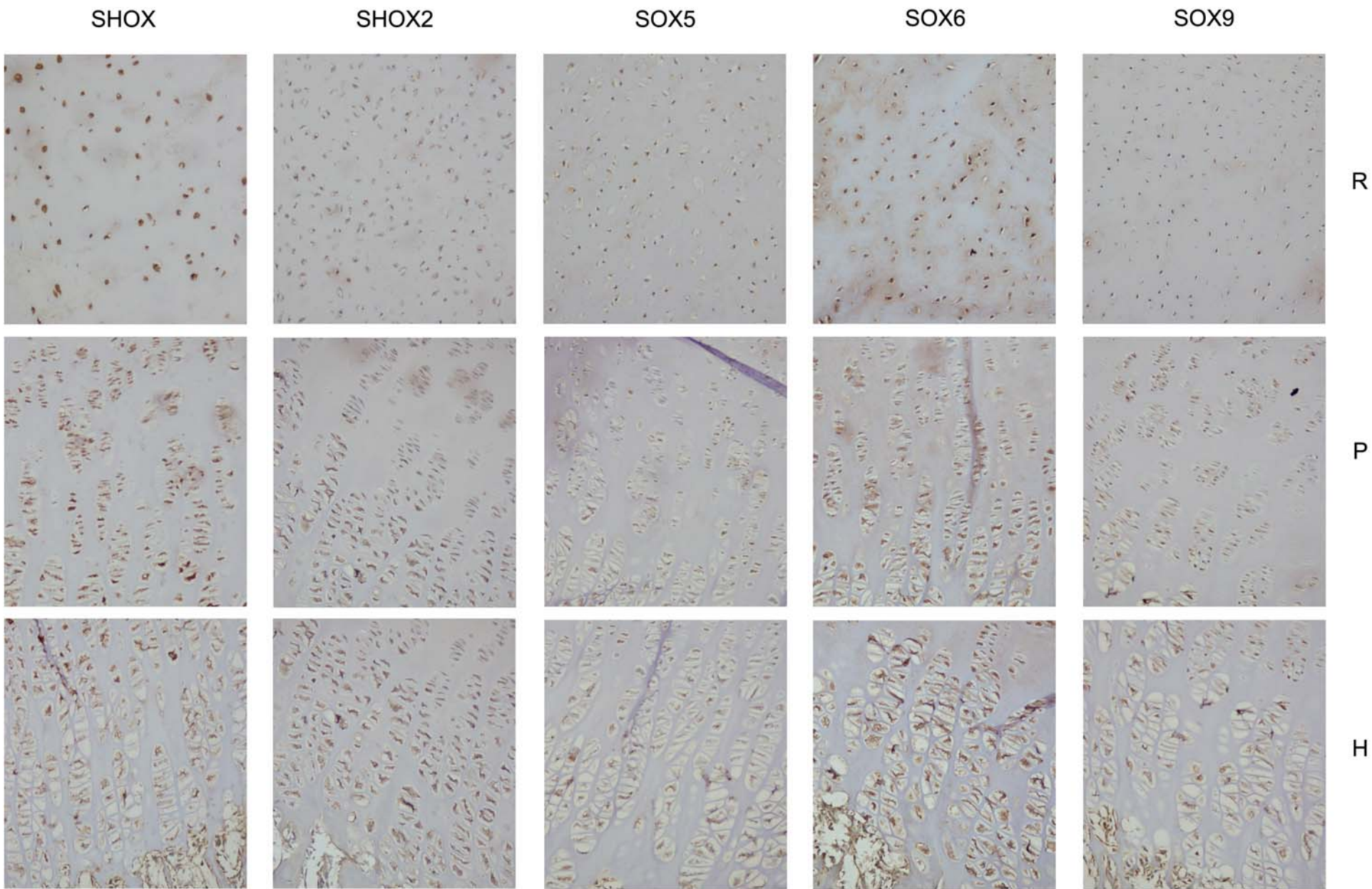




Fig.S4



**Table S1:** Oligonucleotide sequences for the amplification of the SHOX2a cDNA and the cloning of the SHOX2 constructs. The incorporated enzymes sites are indicated in small letters. SHOX2a PCR A antisense oligonucleotide and SHOX2a PCR B sense oligonucleotide flank the sequence to be eliminated.

Constructs	Restriction enzyme sites	Sense oligonucleotide 5'-3'	Antisense oligonucleotide 5'-3'
SHOX2a PCR A	-	ATGGAAGAACTTACGGTTACGG	<u>GCGCTGACTGCCTCC</u> ACAGGGGCCTC GACTTTC
SHOX2a PCR B	-	CTTTCAGCTCCGGGGACAC <u>CTCCGTCAGTCGC</u> <u>G</u>	CTCACAGACCCAGGGCTGC
SHOX2a PCR ligation AB	-	ATGGAAGAACTTACGGTTACGG	CTCACAGACCCAGGGCTGC
pGBT9:SHOX2a	EcoRI/BamHI	GAgatcATGGAGGACGAAGGC	ATggatccTCACAGACCCAGGGCTGC
pACT2:SHOX2a	BamHI/XhoI	ATggatccCGATGGAAGAACTTACGGTTACGG	ActcgagCTCACAGACCCAGGGCTGC
pGBT9:SHOX2b	EcoRI/BamHI	GAgatcATGGAGGACGAAGGC	ATggatccTCACAGACCCAGGGCTGC
pACT2:SHOX2b	BamHI/XhoI	ATggatccGGATGGAGGACGAAGGCC	ActcgagCTCACAGACCCAGGGCTGC
pACT2:SHOX2(139-331)	BamHI/SalI*	GggatccGTAAGCAGAGGCGAAGTCGGAC	CgtcgacTCACAGACCCAGGGCTGCGGC
pACT2:SHOX2(200-331)	BamHI/SalI*	GggatccGTAATCAACTCCATAAAGGTG	CgtcgacTCACAGACCCAGGGCTGCGG
pCDNA3-HA:SHOX2	XbaI/EcoRI	ATtctagaGCGATGGAAGAACTTACG	TgaattcCTCACAGACCCAGGGCTGC
pCDNA3-FLAG:SHOX2			

\* pACT2 vector was cut with BamHI/XhoI enzymes and ligated with the SHOX2 fragment cut with BamHI/SalI.

**Table S2:** Oligonucleotide sequences for the generation of various SHOX2 fragments and SHOX2 missense mutants. The mutated site is indicated by a small letter.

Construct	Construct template	Mutation introduced	Sense oligonucleotide (5'- 3')
pACT2:SHOX2(1-138)	pACT2:SHOX2	p.K139X	CCAGACCAAAATCtAGCAGAGGCGAAG
pACT2:SHOX2(1-200)	pACT2:SHOX2	p.Q201X	GAAAACAAGAAAATtgACTCCATAAAGGTGTTC
pACT2:SHOX2(139-200)	pACT2:SHOX2(139-331)		
pGBT9:SHOX2(K139E)	pGBT9:SHOX2	p.K139E	GGCCAGACCAAAATCgAGCAGAGGCGAAG
pACT2:SHOX2(K139E)	pACT2:SHOX2		
pGBT9:SHOX2(L155V)	pGBT9:SHOX2	p.L155V	GGAACAACTCAATGAGgTGGAGAGGCTTTTTGACG
pACT2:SHOX2(L155V)	pACT2:SHOX2		
pGBT9:SHOX2(A193P)	pGBT9:SHOX2	p.A193P	GGTTTCAAAATCGAAGAcCTAAATGTAGAAAAC
pACT2:SHOX2(A193P)	pACT2:SHOX2		
pGBT9:SHOX2(R196C)	pGBT9:SHOX2	p.R196C	CGAAGAGCTAAATGTtGcAAACAAGAAAATCAACTCC
pACT2:SHOX2(R196C)	pACT2:SHOX2		
pGBT9:SHOX2(R218Q)	pGBT9:SHOX2	p.R218Q	GCCAGTTTGAAGCTTGTcaAGTCGCACCTTATGTC
pACT2:SHOX2(R218Q)	pACT2:SHOX2		
pGBT9:SHOX2(A269D)	pGBT9:SHOX2	p.A269D	CCTGCATCCGCACCTGGaCGCGCACGCGCCCTAC
pACT2:SHOX2(A269D)	pACT2:SHOX2		
pGBT9:SHOX2(R319P)	pGBT9:SHOX2	p.R319P	CTCCAGCATCGCCGATCTCcACTGAAAGCCAAAAAG
pACT2:SHOX2(R319P)	pACT2:SHOX2		
pcDNA3-HA:SHOX2(L155V)	pcDNA3-HA:SHOX2	p.L155V	GGAACAACTCAATGAGgTGGAGAGGCTTTTTGACG
pcDNA3-HA:SHOX2(Q234X)	pcDNA3-HA:SHOX2	p.Q234X	GGATGCCATTTTCAGtAGGATAGTCATTGCAACG

**Table S3:** Oligonucleotide sequences for the mutation screening of the coding exons and intron/exon boundaries of *SHOX2*.

<i>SHOX2</i> Exon	Oligonucleotide sequence		Ann. Temp. (°C)	DMSO (5%)	Size (bp)
	Sense (5' - 3')	Antisense (5' - 3')			
1	TGAGCGCCGGGCTGACGTGC	CCGGGGGTCAGTCAGGTCGT	66	+	396
2	GGATTTGCTGTGCTGTTTTCG	CTCTTTCCTTCTCATCTTACACC	57	-	426
3	GTTTAACTTTGGAATTTGAGGCTGT	CCAAACTTTAGGACTCCATTAACA	54	-	379
4	AGTCCATTTTCAAAGGAATTCTG	GGGCTCAGAGACAGGTGATGTT	57	-	280
5	AAATGCCCTCTCCCCGTGCC	GATAGGGGACGAGGGATGGT	64	+	532

**Table S4:** Oligonucleotide sequences, PCR conditions and amplicon sizes of the *SHOX2* microsatellite markers. Microsatellites are listed in order from telomere to centromere.

Microsatellite marker	Repeat Unit	Oligonucleotide sequence		Size range (bp)	Ann. Temp. (°C)
		Sense (5'-3')	Antisense (5'-3')		
<b>D3S3692</b>	(CA)	<b>CCATGCTCGTGGTAGAAGTC</b>	<b>ACCTAGCCTCAGAAGGCATC</b>	<b>190-204</b>	<b>55</b>
<b>D3S4638</b>	(CA)	<b>GATCCAGCAAACAAGACTAGG</b>	<b>CATATCTTTTGGACTCAAGGG</b>	<b>222-254</b>	<b>55</b>
<b>D3S4639</b>	(AAAT)	<b>CACAGAACTATTTTGAATTGG</b>	<b>CAGAATGCCTACTTTACTCAC</b>	<b>244-256</b>	<b>48</b>
<b>D3S4640</b>	(TG)	<b>GACTCAATTGGTTAGCTGTG</b>	<b>TGAATATCCTAATGCCTGTG</b>	<b>241-247</b>	<b>51</b>



**Table S5:** *SHOX2* self-designed MLPA. Chromosomal and *SHOX2* location, probe lengths and ligation site sequences are indicated for the *SHOX2* and three control fragments.

Probe	Chromosome Location	<i>SHOX2</i> Location	Length (bp)	Sequence at Ligation Site
SHOX2- 1	3q25.32	Exon 1	93	GCGATGGAAGAACTTACGGCGTT- CGTCTCCAAGTCTTTTGACCAGAAAGTG
SHOX2- 2	3q25.32	Exon 2	117	CAAAATCAAGCAGAGGCGAAGTCGGACCAAT- TTCACCCTGGAACAACCTCAATGAGCTG
SHOX2- 3	3q25.32	Intron 2	122	CAGAGCAGTCACGTTGAAGAGGAAA- AGTAATAATAGGCTGCCTTGGTCATCACAGC
SHOX2- 4	3q25.32	Exon 4	100	GAAGCTTGTAAGTCGCACCTTATGTCA- ACGTAGGTGCTTTAAGGATGCCATTTTCAGC
SHOX2- 5	3q25.32	Exon 5	133	GCTCTGTTTCTATTCTGTTGTCACCCTAGGA- TAGTCATTGCAACGTGACGCCCTTG
WBSCR1	7q11.23	-	89	GGTAGCTCTCGAGAATCTAGAGGTGG- ATGGGATTCCCGGGATGACTTC
RAI1	17p11.2	-	112	GGCAAGGAAAAGTGGCCTTTTGCGTGACA- CAGAAGTGGACACATCATTCTGATCTCAGGGCTCT
MAPT	17q21.31	-	128	CCTGGGACTTTAGGGCTAACCAGTTCTCTTTGTA- AGGACTTGTGCCTCTTGGGAGACGTCCACCCGTTTC







Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Medical Genetics

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ejmg>



## Short report

# Identification of the first *de novo* PAR1 deletion downstream of *SHOX* in an individual diagnosed with Léri–Weill dyschondrosteosis (LWD)

Eva Barroso<sup>a,b,1</sup>, Sara Benito-Sanz<sup>a,b,1</sup>, Alberta Belinchón<sup>a,b</sup>, Patricia Yuste-Checa<sup>a,b</sup>, Ricardo Gracia<sup>c</sup>, Ángel Aragonés<sup>d</sup>, Ángel Campos-Barros<sup>a,b</sup>, Karen E. Heath<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Institute of Medical and Molecular Genetics (INGEMM), Hospital Universitario La Paz, Universidad Autónoma de Madrid, IdiPaz, Madrid, Spain

<sup>b</sup> Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

<sup>c</sup> Department of Pediatric Endocrinology, Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain

<sup>d</sup> Department of Pediatrics, Hospital Virgen de la Salud, Toledo, Spain

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 4 January 2010

Accepted 2 April 2010

Available online 20 April 2010

### Keywords:

Léri–Weill dyschondrosteosis

LWD

PAR1

*SHOX*

## ABSTRACT

Léri–Weill dyschondrosteosis (LWD, MIM 127300), is a dominantly inherited skeletal dysplasia with disproportionate short stature, mesomelic limb shortening, and the characteristic Madelung deformity. Two regions of the pseudoautosomal region 1 (PAR1) have been shown to be involved in LWD, *SHOX* (short-stature homeobox-containing gene) and the downstream enhancer region. We report our genetic findings of a young girl clinically diagnosed with LWD. We analyzed the proband and her family using MLPA and microsatellite analysis. We identified a deletion, 726–866 kb in size, of the downstream *SHOX* enhancer region in the proband. Neither parent carried the deletion. Microsatellite analysis showed that the deleted allele was of paternal origin. The mutation is more likely to have arisen from a *de novo* event but paternal gonadal mosaicism cannot be excluded. In conclusion, we report the clinical and molecular details of the first case of a *de novo* deletion of the downstream PAR1 region in an LWD individual. *De novo* deletions of *SHOX* and the downstream enhancer region must be therefore considered in cases of isolated LWD.

© 2010 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

## 1. Introduction

Léri–Weill dyschondrosteosis (LWD, MIM 127300), is a dominantly inherited skeletal dysplasia with disproportionate short stature, mesomelic limb shortening, and the characteristic Madelung deformity of the forearm: the bowing of the radius and the distal dislocation of the ulna. Heterozygous deletions or mutations in one of two regions of the pseudoautosomal region 1 (PAR1), the short-stature homeobox-containing gene (*SHOX*, MIM 313865) [1,18] or the downstream enhancer region [4,11,16] have been shown to be involved in approximately 60% of LWD cases [2,8,12]. Compound heterozygous or homozygous mutations of one or both regions result in Langer mesomelic dysplasia (LMD; MIM 249700) [5,7,17,21], a more severe form with severely shortened long bones of the limbs, Madelung deformity, deformity of the humeral head, angulation of the radial shaft, carpal distortion, short femoral neck,

and hypoplastic or absent proximal half of the fibula. Deletions are the most frequent alteration observed, due to the high incidence of Alu and LINE elements which has resulted in a ~20-fold higher recombination fraction per unit of physical distance for the whole PAR1, as compared with the genome-average rate of 1 cM/Mb [14]. Even within different segments of the PAR1, the recombination fraction seems to be variable, ranging from 13 to 23-fold higher at the telomere to 26–38-fold increase near the pseudoautosomal boundary [13].

## 2. Case description

We report the clinical and molecular details of a female patient who was referred to the Pediatric Endocrinology clinic at the age of eight years and eight months for a presumptive clinical diagnosis of LWD. She was the first child born to non-consanguineous Spanish parents. She was born at 36 weeks with normal body length (49 cm, 0.95 standard deviations, SDS) and body weight (2500 g, –0.37 SDS). Both parents are of normal height (father 184.5 cm, 1.56 SDS; mother 166.2 cm, 0.83 SDS) for Spanish standards [19]. Various members of the maternal line were reported to have scoliosis and the maternal grandfather had bowed legs. No relevant family

\* Corresponding author at: Institute of Medical and Molecular Genetics (INGEMM), Hospital Universitario La Paz, P<sup>o</sup> Castellana 261, 28046 Madrid, Spain. Tel.: +34 91 727 7467; fax: +34 91 207 1040.

E-mail address: [kheath.hulp@salud.madrid.org](mailto:kheath.hulp@salud.madrid.org) (K.E. Heath).

<sup>1</sup> These authors have contributed equally to the work.



**Fig. 1.** X-rays of the wrists of the proband with LWD (9 years, 3 months) showing bilateral Madelung deformity, shortened and bowed radius and ulna leading to the dorsal dislocation of the distal ulna and limited mobility of the wrist and elbow. A: Left wrist, B: right wrist, C: left wrist coronal section; D: right wrist coronal section.

history was reported by the father. Her height at 8 yrs and 8 m was 126 cm (−1.04 SDS), her weight 29 kg (−0.32 SDS), arm span 122 cm and height:arm span ratio 0.96. IGF1 and IGFBP3 levels were 161 ng/ml (−0.07 SDS) and 3.64 µg/ml (−0.04 SDS) respectively. Though her height lies within normal range, she presented with a moderate to severe form of the classic bilateral Madelung deformity (Fig. 1), characteristic of LWD. Informed consent was obtained from all participants.

### 3. Methods

Analysis of the *SHOX*/PAR1 locus for deletion and duplication analysis was approached by MLPA (Salsa P018D, MRC Holland). Point mutations, small deletions or insertions of the five coding exons and intron:exon boundaries of *SHOX* were screened using high resolution melting analysis (HRM) and DNA sequencing.

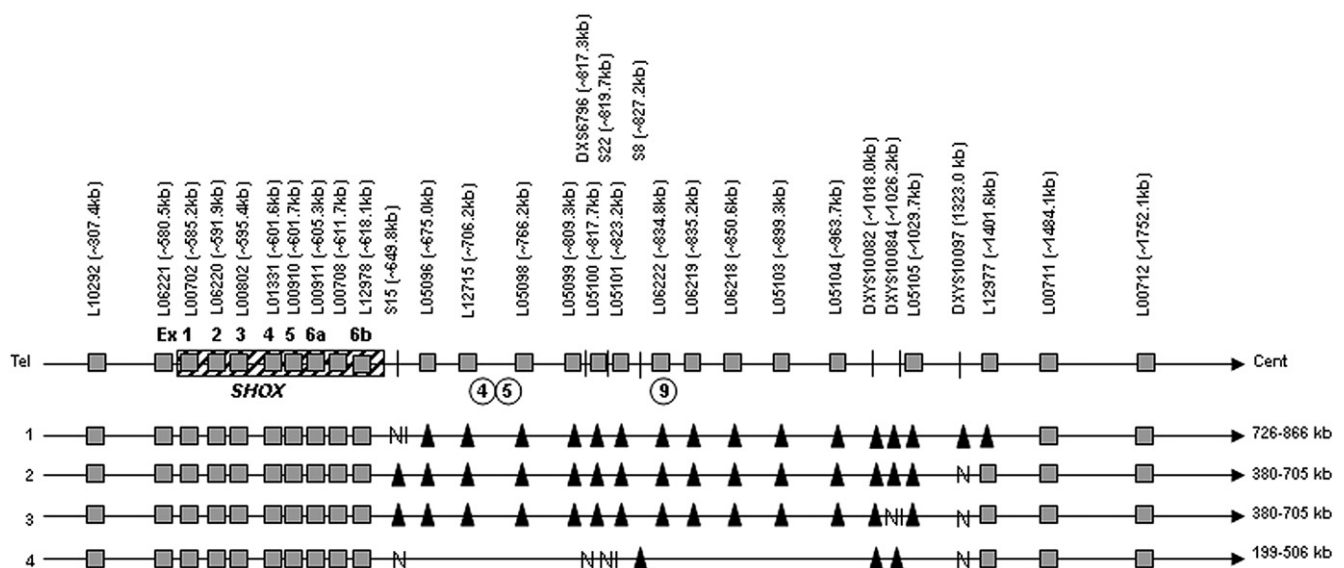
### 4. Results

A large heterozygous PAR1 deletion downstream of *SHOX* was identified by MLPA, extending from probes L05096 to L12977 (Fig. 2). The deleted sequence was between 726 kb and 866 kb in length (Fig. 2). We subsequently screened for the deletion in both parents by MLPA. Neither parent presented with the deletion. To determine which parental allele had been deleted and to verify paternity, we analyzed a panel of microsatellite markers from the downstream PAR1 region [3,4] and two autosomes, chromosomes 14 and 22. The presence and absence of the deletion was confirmed in the proband and parents, respectively. Microsatellite analysis showed that the deleted allele was of paternal origin (Fig. 3).

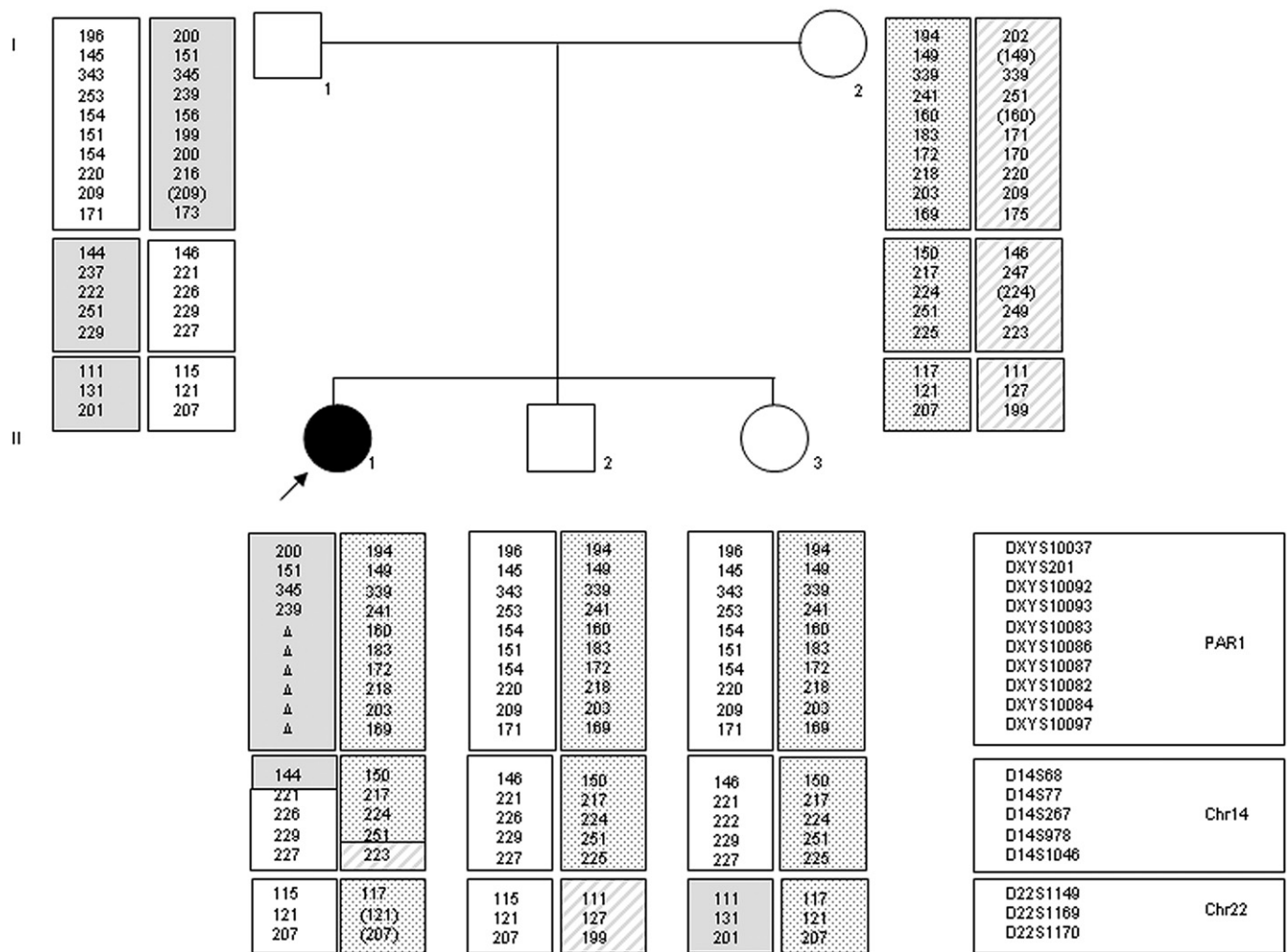
### 5. Discussion

Three enhancers of *SHOX* transcription have been identified in the PAR1 downstream of *SHOX*, using enhancer assays in osteocyte cell lines [10] or chicken embryos [16]. All three lie within the deleted region, which would explain the phenotype of LWD, observed in the proband.

We subsequently screened for the deletion in both parents, who were clinically normal with heights within the normal range, although there was a family history of scoliosis in the maternal line, a feature observed in many LWD and Turner individuals. MLPA revealed that neither parent presented with the deletion in DNA from leucocytes. Microsatellite analysis confirmed the presence and absence of the deletion in the proband and parents, respectively,



**Fig. 2.** Characterization of the PAR1 deletion identified in the proband and three other downstream PAR1 deletions identified using MLPA (*SHOX*/PAR1 salsa P018D1), microsatellite marker and SNP analysis. Genomic coordinates (bp) are according to the X chromosome sequence NC\_000023.10, NCBI build 37.1. Diagram not drawn to scale. *SHOX* is shown as a striped rectangle. Grey boxes indicate the location of the MLPA probes and those present as two copies. Black triangles (▲) indicate deleted probes. N indicates the presence of two alleles for a microsatellite marker or amplicon S15, which includes six SNPs [3]. NI indicates non-informative for a microsatellite marker or the S15 amplicon. Deletion 2 has been previously reported [3] but no MLPA was undertaken at that time point. Deletion 4, present in a patient with LMD, was previously characterized using microsatellite markers and SNPs [11]. The three *SHOX* enhancers marked as conserved non-coding DNA elements (CNE) 4, 5 and 9 are shown in circles below the chromosome. All three enhancers are located within the deletions observed in cases 1–3, whilst only CNE9 is found within the deletion observed in case 4.



**Fig. 3.** Microsatellite analysis of PAR1 and chromosomes 14 and 22, in the studied family. The PAR1 data shows that the paternal allele has been deleted in the proband. The two siblings, a brother and a sister, were shown to carry the alternative paternal allele, compared to the proband, thus revealing that a recombinational event had also occurred in the PAR1 in this family. Paternity has also been verified using the PAR1 and autosomal microsatellite markers.

and showed that the deleted allele was of paternal origin. Thus, the mutation arose either by a *de novo* event or, alternatively, the father was a germline carrier of the deletion. We subsequently analyzed two siblings for the presence of the deletion by MLPA and microsatellite marker analysis. Both were non-carriers of the deletion and were shown to carry a different paternal allele from the proband (Fig. 3). Although no definitive answer can be obtained from this data regarding the origin of the deletion, we consider a *de novo* event as the more likely option. Several cases of *de novo* *SHOX* deletions have been previously reported in LWD cases [6,9,12,15]. In the majority of these cases as well as in individuals with Turner syndrome due to monosomy of chromosome X (45, XO) or chromosomal aberrations, the paternal allele seems to be preferentially deleted due to meiotic errors (reviewed in Ref. [20]). Thus, *de novo* deletions not only of *SHOX* but also of the downstream enhancer region must be considered in isolated cases of LWD.

Including the deletion described here, we have now, in total, detected four large downstream deletions, two of which have been previously reported (Fig. 2) [4,7]. As shown in Fig. 2, three of the deletions (no. 1–3) may share a common 5' deletion breakpoint while two of the deletions (no. 2 and 3) may share both 5' and 3' breakpoints. Reviewing the cases in the literature, 10 LWD and three ISS patients reported by Chen et al., 2009 [8], may also have

this common 5' breakpoint. We subsequently analyzed this region (620146–675000) for repetitive elements using Repeatmasker ([www.repeatmasker.org](http://www.repeatmasker.org)). A total of 65 Alu elements and 13 LINES were identified in the 5' breakpoint region, reducing the possibility of a common breakpoint. The 3' breakpoint region in proband 1 (1401000–1484000) is also highly repetitive, with a total of 147 Alu elements and 11 LINES. The high frequency of repetitive sequences in the vicinity of the breakpoints can lead us to hypothesize that a non-allelic homologous recombination (NAHR) event has occurred.

In conclusion, this report describes the first case of a *de novo* deletion of the downstream PAR1 region in an LWD individual. Deletions of *SHOX* and the downstream enhancer region must be therefore considered in cases of isolated LWD.

#### Acknowledgements

We thank Professor Christine Hall for her examination of the radiographs and Noelia Sanchez-Bolivar for her technical help. This work was supported by grants from the "Fondo de Investigación Sanitaria" (PI08/90270) and the "Ministerio de Ciencia e Innovación" (MICINN, SAF2006-00663). Sara Benito-Sanz was a recipient of a PhD fellowship from the MICINN (SAF2006-00663) and

currently a CIBERER postdoctoral fellowship. Alberta Belinchón and Patricia Yuste-Checa were supported with CIBERER Lanzadera Ph. D fellowships.

## References

- [1] V. Belin, V. Cusin, G. Viot, D. Girlich, A. Toutain, A. Moncla, M. Vekmans, M.L. Merrer, A. Munnich, V. Cormier-Daire, SHOX mutations in dyschondrosteosis (Léri–Weill syndrome). *Nat. Genet.* 19 (1998) 67–69.
- [2] S. Benito-Sanz, D. Gorbenco Del Blanco, M. Aza-Carmona, P. Lapunzina, J. Argente, A. Campos-Barros, K.E. Heath, PAR1 deletions downstream of *SHOX* are the most frequent defect in a Spanish cohort of Léri–Weill dyschondrosteosis (LWD) probands. *Hum. Mutat.* 27 (2006) 1062.
- [3] S. Benito-Sanz, D. Gorbenco del Blanco, C. Huber, N.S. Thomas, M. Aza-Carmona, D. Bunyan, V. Maloney, J. Argente, V. Cormier-Daire, A. Campos-Barros, K.E. Heath, Characterization of *SHOX* deletions in Léri–Weill dyschondrosteosis (LWD) reveals genetic heterogeneity and no recombination hotspots. *Am. J. Hum. Genet.* 79 (2006) 409–414.
- [4] S. Benito-Sanz, N.S. Thomas, C. Huber, D. Gorbenco del Blanco, M. Aza-Carmona, J.A. Crolla, V. Maloney, J. Argente, A. Campos-Barros, V. Cormier-Daire, K.E. Heath, A novel class of pseudoautosomal region 1 (PAR1) deletions downstream of *SHOX* is associated with Léri–Weill dyschondrosteosis (LWD). *Am. J. Hum. Genet.* 77 (2005) 533–544.
- [5] R. Bertorelli, L. Capone, F. Ambrosetti, L. Garavelli, L. Varriale, V. Mazza, I. Stanhellini, A. Percesepe, A. Forabosco, The homozygous deletion of the 3' enhancer of the *SHOX* gene causes Langer mesomelic dysplasia. *Clin. Genet.* 72 (2007) 490–491.
- [6] G. Binder, A. Renz, A. Martinez, A. Keselman, V. Hesse, S.W. Riedl, G. Hausler, S. Fricke-Otto, H. Frisch, J.J. Heinrich, M.B. Ranke, *SHOX* haploinsufficiency and Léri–Weill dyschondrosteosis: prevalence and growth failure in relation to mutation, sex and degree of wrist deformity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89 (2004) 4403–4408.
- [7] A. Campos-Barros, S. Benito-Sanz, J.L. Ross, A.R. Zinn, K.E. Heath, Compound heterozygosity of *SHOX*-encompassing and downstream PAR1 deletions results in Langer mesomelic dysplasia (LMD). *Am. J. Med. Genet. Part A* 143 (2007) 933–938.
- [8] J. Chen, G. Wildhardt, Z. Zhong, R. Roeth, B. Weiss, D. Steinburger, J. Decker, W.F. Blum, G.A. Rappold, Enhancer mutations of the *SHOX* gene as a frequent downstream regulatory domain cause of short stature – the essential role of a 250 kb. *J. Med. Genet.* (2009) (epub ahead of print).
- [9] C. Falcinelli, L. Lughetti, A. Percesepe, G. Calabrese, F. Chiarelli, M. Cisternino, L. De Sanctis, I. Pucarelli, G. Radetti, M. Wasniewska, G. Weber, L. Stuppia, S. Bernsconi, A. Forabosco, *SHOX* point mutations and deletions in Léri–Weill dyschondrosteosis. *J. Med. Genet.* 39 (2002) e33.
- [10] M. Fukami, F. Kato, T. Tajima, S. Yokoya, T. Ogata, Transactivation function of an approximately 800-bp evolutionarily conserved sequence at the *SHOX* 3' region: implication for the downstream enhancer. *Am. J. Hum. Genet.* 78 (2006) 167–170.
- [11] M. Fukami, T. Okuyama, S. Yamamori, G. Nishimura, T. Ogata, Microdeletion in the *SHOX* 3' region associated with skeletal phenotypes of Langer mesomelic dysplasia in a 45, X/46, X, r(X) infant and Léri–Weill dyschondrosteosis in her 46, XX mother: implication for the *SHOX* enhancer. *Am. J. Med. Genet. Part A* 137 (2005) 72–76.
- [12] C. Huber, M. Rosilio, A. Munnich, V. Cormier-Daire, French *SHOX* GeNeSIS module: high incidence of *SHOX* anomalies in individuals with short stature. *J. Med. Genet.* 43 (2006) 735–739.
- [13] S. Lien, J. Szyda, B. Schechinger, G. Rappold, N. Arnheim, Evidence for heterogeneity in recombination in the human pseudoautosomal region: high resolution analysis by sperm typing and radiation-hybrid mapping. *Am. J. Hum. Genet.* 66 (2000) 557–566.
- [14] C.A. May, A.C. Shone, L. Kalydjieva, A. Sajantila, A.J. Jeffreys, Crossover clustering and rapid decay of linkage disequilibrium in the Xp/Yp pseudoautosomal gene *SHOX*. *Nat. Genet.* 31 (2002) 272–275.
- [15] E. Morizio, L. Stuppia, V. Gatta, D. Fantasia, P. Guanciali-Franchi, M.M. Rinaldi, G. Scarano, D. Conocolino, A. Giannotti, A. Verrotti, F. Chiarelli, G. Calabrese, G. Palka, Deletion of the *SHOX* gene in patients with short stature of unknown cause. *Am. J. Med. Genet. Part A* 119 (2003) 293–296.
- [16] N. Sabherwal, F. Bangs, R. Roth, B. Weiss, K. Jantz, E. Tiecke, G.K. Hinkel, C. Spaich, B.P. Hauffa, H. van der Kamp, J. Kapeller, C. Tickle, G. Rappold, Long-range conserved non-coding *SHOX* sequences regulated expression in developing chicken limb and are associated with short stature phenotypes in human patients. *Hum. Mol. Genet.* 16 (2007) 210–222.
- [17] D.J. Shears, E. Guillen-Navarro, M. Sempere-Miralles, R. Domingo-Jimenez, P. J. Scambler, R.M. Winter, Pseudodominant inheritance of Langer mesomelic dysplasia caused by a *SHOX* homeobox missense mutation. *Am. J. Med. Genet.* 110 (2002) 153–157.
- [18] D.J. Shears, H.J. Vassal, F.R. Goodman, R.W. Palmer, W. Reardon, A. Superti-Furga, P.J. Scambler, R.M. Winter, Mutation and deletion of the pseudoautosomal gene *SHOX* cause Léri–Weill dyschondrosteosis. *Nat. Genet.* 19 (1998) 70–73.
- [19] B. Sobradillo, A. Aguirre, U. Aresti, A. Bilbao, C. Fernández-Ramos, A. Lizárraga, H. Lorenzo, L. Madariaga, I. Rica, I. Ruiz, E. Sánchez, C. Santamaría, J.M. Serrano, A. Zabala, B. Zurimendi, M. Hernández, Curvas y Tablas de crecimiento (Estudios Longitudinal y Transversal). Fundación Faustino Orbegozo Eizaguirre Bilbao, 2002, pp. 1–36.
- [20] A. Uematsu, T. Yorifuji, J. Muroi, M. Kawai, M. Mamada, M. Kaji, C. Yamanaka, T. Momoi, T. Nakahata, Parental origin of normal X chromosomes in Turner syndrome patients with various karyotypes: implications of the mechanism leading to generation of a 45, X karyotype. *Am. J. Med. Genet.* 111 (2002) 134–139.
- [21] A.R. Zinn, F. Wei, L. Zhang, F.F. Elder, C.L. Scott Jr., P. Marttila, J.R. Ross, Complete *SHOX* deficiency causes Langer mesomelic deficiency. *Am. J. Med. Genet.* 110 (2002) 158–163.